

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Stefanie Costa Pinto Lopes



**“AVALIAÇÃO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTI-  
PLASMODIAL DA VIOLACEÍNA EXTRAÍDA DA  
*CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*”**

Tese (ou Dissertação) apresentada  
ao Instituto de Biologia para  
obtenção do Título de Mestre em  
Genética e Biologia Molecular, na  
área de Imunologia.

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Stefanie Costa Pinto Lopes.  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientador(a): Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

**L881a**

Lopes, Stefanie Costa Pinto  
Avaliação in vivo e in vitro da atividade anti-plasmodial da violaceína extraída de *Chromobacterium violaceum* / Stefanie Costa Pinto Lopes. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Fabio Trindade Maranhão Costa.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Malária. 2. Antimaláricos. 3. Violaceína. 4. *Chromobacterium violaceum*. I. Costa, Fabio Trindade Maranhão. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Avaliation of the in vitro and in vivo antimalarial activity of violacein extrated from *Chromobacterium violaceum*.

**Palavras-chave em inglês:** Malaria; Antimalarials; Violacein; *Chromobacterium violaceum*.

**Área de concentração:** Imunologia.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Fabio Trindade Maranhão Costa, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Irene da Silva Soares.

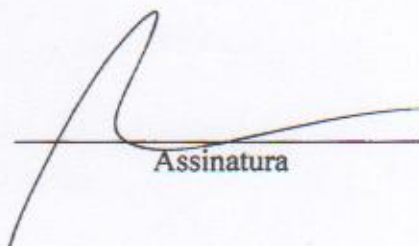
**Data da defesa:** 21/02/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 21 de fevereiro de 2008.

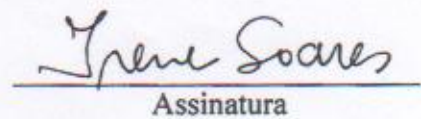
## BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa (Orientador)



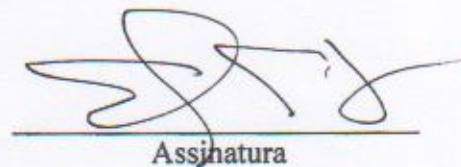
Assinatura

Profa. Dra. Irene da Silva Soares



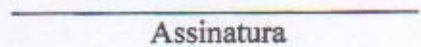
Assinatura

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira



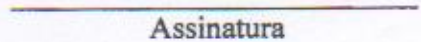
Assinatura

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brocchi



Assinatura

## DECLARAÇÃO

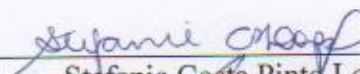
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação/ tese de mestrado/doutorado intitulada Avaliação *in vivo* e *in vitro* da atividade anti-plasmodial da violaceína extraída da *Chromobacterium violaceum*

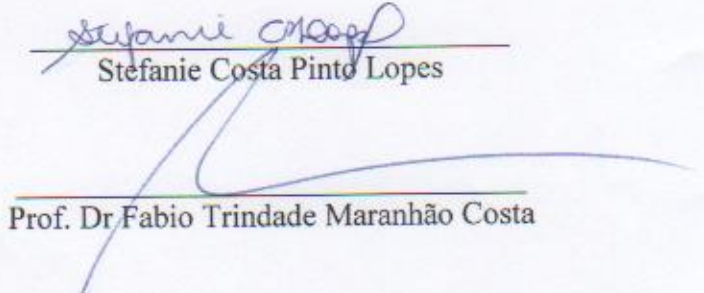
( ) não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 002/06, referente a bioética e biossegurança.

( ) está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº \_\_\_\_\_), intitulado \_\_\_\_\_

(x) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 985-1). *pp. 273/06*


( ) tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº \_\_\_\_\_).

  
Stefanie Costa Pinto Lopes

  
Prof. Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido



Nome:

Função:

Profa. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO  
Presidente  
Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEa/IB - UNICAMP



## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Fabio Trindade Maranhão Costa pela orientação prestada, pela confiança dispensada e pelas oportunidades oferecidas.

Aos professores Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e Dra. Irene da Silva Soares pela participação na banca examinadora.

À Prof. Dra. Clarisse e Prof. Dr. João Ernesto Carvalho pela participação na qualificação e pré-banca, respectivamente

À Prof. Dra. Selma Giorgio pela participação na pré-banca e qualificação, e pelas sugestões dadas. Assim como pela colaboração com o meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pela colaboração e auxílio no desenvolvimento deste projeto.

Ao professor Dr. Gehrard Wunderlich e Uta Goelnitz pelo auxílio no estabelecimento da cultura de *Plasmodium falciparum* em nosso laboratório.

À Prof. Dra. Giselle Zenker e Prof. Dr. Nelson Durán pela atenção e pelo fornecimento da violaceína, sem a qual o projeto não teria andamento.

À Prof. Dra. Mary Ann Foglio pela colaboração em outros projetos e pelo fornecimento do artesunato sódico usado nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Francesco Langone por permitir a utilização dos seus equipamentos e seu laboratório para a elaboração dos cortes histológicos.

Ao Prof. Dr. Paulo Mazzafera por permitir a utilização do Cintilador Beta para os ensaios com material radioativo.

Aos funcionários do DMI, em especial ao Seu Antônio pelo cuidado com os animais, Daniel por sempre estar disposto a ajudar, e ao Zé Raimundo pela ajuda com as soluções.

A todos os alunos do DMI pelas conversas de corredor, a troca de conhecimento e colaboração nos experimentos.

À Lourdes, que como Secretaria da Pós Graduação da Genética, respondeu todas as minhas dúvidas, lembrou meus prazos e tornou possível o desenvolvimento desta tese.

Às companheiras de laboratório: Bruna, Juliana, Marcele e Yara pela amizade e também pela ajuda na elaboração dessa tese. Em especial a Bruna, pelo auxílio na cultura dos parasitas *in vitro* e a Yara pela ajuda com a padronização dos ensaios *in vivo*.

Aos alunos do Prof. Dr. Francesco Langone, em especial o Gustavo, pelo auxílio nos cortes histológicos.

Às minhas amigas: Ana Paula, Gabriela, Karen, Mariana e Marizinha por fazerem parte da minha vida, ser minha família campineira e por terem me proporcionado momentos de alegria e descontração em todos esses anos.

As minhas veteranas Mari Lazarini, Alessandra e Bruna por me mostrarem a alegria da vida.

Aos meus mais novos amigos Pepe, Digão e Tânia por me escutarem, me compreenderem e me ajudar em tudo o que for preciso.

As minhas amigas de Santos Carla, Karol, Renata, Clarissa e Julia por entender que a amizade suporta a distância.

Aos amigos que não foram citados, mas que com certeza estão de coração nessa tese.

A minha mãe por ter sempre ter me estimulado a estudar e dar valor ao ensino.

A meu pai pelo carinho e atenção redobrados, por acreditar em mim e me apoiar em minhas decisões.

As minhas irmãs por terem inúmeras vezes me apoiado, acreditado incondicionalmente no meu potencial, por fazerem parte da minha vida e também dessa conquista.

A CAPES pela bolsa fornecida nesses dois anos de trabalho.

Ao CNPq pelo financiamento deste projeto.

A Unicamp por possibilitar o desenvolvimento deste projeto de pesquisa.

## RESUMO

A violaceína é um pigmento violeta extraído da bactéria Gram-negativa *Chromobacterium violaceum*. Diversos trabalhos atribuíram à violaceína diferentes atividades biológicas tais como bactericida, antiviral, fungicida e antitumoral. Os efeitos da violaceína também foram observados contra protozoários patogênicos, como *Leishmania sp* e *Trypanossoma sp*. Neste trabalho, avaliamos a atividade antimalárica da violaceína *in vitro* e *in vivo* contra *Plasmodium* humano e murino, respectivamente. Neste sentido, a violaceína se mostrou tão eficiente quanto o quinino em eliminar *P. falciparum* (3D7), mas três vezes menos eficiente que a cloroquina. Além disso, não encontramos diferença na sua atividade contra formas jovens e maduras, mostrando uma atuação similar nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasita. Os experimentos *in vivo* utilizando camundongos infectados com PcchAS tratados por 11 dias consecutivos (0-10) revelaram uma potente atividade desta droga, inibindo o desenvolvimento parasitário em até 86% no pico da parasitemia. Também foi encontrado 60% de inibição quando o tratamento iniciou-se 5 dias após o estabelecimento da infecção. Quando administrada em animais infectados com uma cepa murina letal (PcchAJ), a violaceína protegeu 80% dos animais, em contraste à 100% de mortalidade dos animais não tratados. A comparação do ED<sub>50</sub> demonstrou que a violaceína é tão eficiente quanto o artesunato e 2 vezes mais ativa que a cloroquina, sob as mesmas condições de tratamento. Finalmente, animais naive tratados com a violaceína durante 11 dias consecutivos não mostraram alterações na densidade de glóbulos vermelhos e no peso. Também não foi observado nenhum dano morfológico nos cortes histológicos. Coletivamente, estes resultados demonstram claramente o potencial antimalárico da



violaceína e abre perspectivas para o entendimento dos mecanismos envolvidos na inibição parasitária por este composto.

**ABSTRACT**

Violacein is a violet pigment extracted from the bacteria Gram-negative *Chromobacterium violaceum*. Growing bodies of evidences have implicated violacein as an antimicrobial, antifungal, antitumoral, and a moderate trypanocidal and leishmanial activity has also been observed. Herein, we evaluated the anti-malarial activity of violacein against murine and human-derived *Plasmodium*. Indeed, violacein showed to be efficient in killing *P. falciparum* (3D7 strain) as much as quinine, but 3 fold less pronounced than chloroquine. Moreover, this anti-*Plasmodial* activity detected was direct against both young and mature stages of this human parasite. In vivo experiments in *P. c. chabaudi* AS (PcchAS) infected mice treated during 10 consecutive days after infection (0-10) revealed a powerful activity of this drug, by inhibiting parasite burden up to 86%. Also, 60% of inhibition was noticed when violacein was administrated 5 days after infection establishment. When administrated in mice infected with a lethal strain of murine-derived *Plasmodium* (PcchAJ) violacein protected 80% of these mice, in contrast to 100% of mortality reported to the non-treated animals. ED<sub>50</sub> comparisons demonstrated that violacein was efficient as much as artesunate and twice more active than chloroquine. Finally, naïve mice inject with violacein during 10 consecutive days did not display alterations on red blood cell density; weight and neither morphological damages were noticed in spleen and liver histological sections. Collectively, these data clearly demonstrated the anti-malarial effect of violacein and open perspectives to understating the mechanisms involved in killing this parasite by this compound.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ACT</b>	Tratamento combinado à base de artemisinina
<b>CQ</b>	Cloroquina
<b>ED<sub>50</sub></b>	Dose necessária para reduzir a parasitemia em 50% em relação ao controle
<b>EI</b>	Eritrócitos infectados
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração necessária para inibir em 50% o desenvolvimento parasitário em relação ao controle.
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>MQ</b>	Mefloquina
<b>PcchAJ</b>	<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> AJ
<b>PcchAS</b>	<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i> AS
<b>QN</b>	Quinino
<b>SP</b>	Sulfadoxina- Pirimetamina

## SUMÁRIO

<b>Introdução .....</b>	<b>14</b>
1. Parasita e Ciclo de vida .....	15
2. Malária no contexto mundial .....	18
3. A problemática .....	20
4. A violaceína .....	24
<b>Objetivos .....</b>	<b>29</b>
1. Objetivo geral .....	30
2. Objetivos específicos .....	30
2.1. Análise <i>in vitro</i> .....	30
2.2. Análise <i>in vivo</i> .....	30
<b>Metodologia .....</b>	<b>32</b>
1. Purificação da violaceína .....	33
2. Análise <i>in vitro</i> .....	33
2.1 Cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i> .....	33
2.2 Sincronização de <i>P. falciparum</i> .....	34
2.3 Atividade antimalárica .....	34
3. Análise <i>in vivo</i> .....	35
3.1 Animais e parasita .....	35
3.2 Análise dos sintomas clínicos .....	36
3.3 Atividade antimalárica .....	37
3.4 Histologia .....	39
3.5 Toxicidade da violaceína .....	39
3.6 Análise estatística .....	40



<b>Resultados .....</b>	<b>41</b>
1. Atividade <i>in vitro</i> anti-malária da violaceína .....	42
2. Atividade <i>in vivo</i> anti-malária da violaceína .....	50
3. Toxicidade da violaceína em animais <i>naïve</i> .....	62
<b>Discussão .....</b>	<b>66</b>
<b>Conclusões .....</b>	<b>73</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>75</b>
<b>Anexo 1 .....</b>	<b>89</b>
<b>Anexo 2 .....</b>	<b>123</b>

## *Introdução*

## 1. Parasita e Ciclo de vida

A malária é causada por um protozoário intracelular do gênero *Plasmodium*, sendo que existem quatro espécies capazes de infectar o homem: *Plasmodium malariae*, *P. ovale*, *P. vivax* e *P. falciparum*. Dentre estes, o *P. falciparum* é o mais importante no tocante à taxa de mortalidade, uma vez que sua infecção está associada às formas graves de infecções maláricas, tais como; malária cerebral e malária gestacional, decorrentes da citoadesão de eritrócitos infectados (EI) nas microvasculaturas cerebrais ou no trofoblasto placentário, respectivamente (Costa *et al.*, 2006).

Nas quatro espécies de *Plasmodium* que afetam o ser humano, o ciclo de vida é essencialmente o mesmo. Apresenta a fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado, o mosquito do gênero *Anopheles* e a fase assexuada (esquizogonia) com a multiplicação no hospedeiro vertebrado. Esta última é composta de um ciclo pré-eritrocítico (assintomático), que ocorre nas células hepáticas, e o ciclo eritrocítico, que se desenvolve nos glóbulos vermelhos e é responsável pelos sintomas, inclusive da malária grave (sintomático).

Em indivíduos não imunes com infecção por *P. falciparum* o período assintomático, desde a picada do mosquito até a invasão dos hepatócitos, é em geral cerca de 14 dias. No entanto, este período depende da carga parasitária injetada e do grau de imunidade e nutricional do indivíduo. Os sinais clínicos da malária ocorrem devido à ruptura dos esquizontes e destruição dos eritrócitos. A maioria dos pacientes apresenta febre, dor de cabeça, calafrios e sudorese. No entanto, outros sintomas como tonturas, dores abdominais, náuseas, diarreia e vômitos também podem estar presentes (Trampuz *et al.*, 2003).

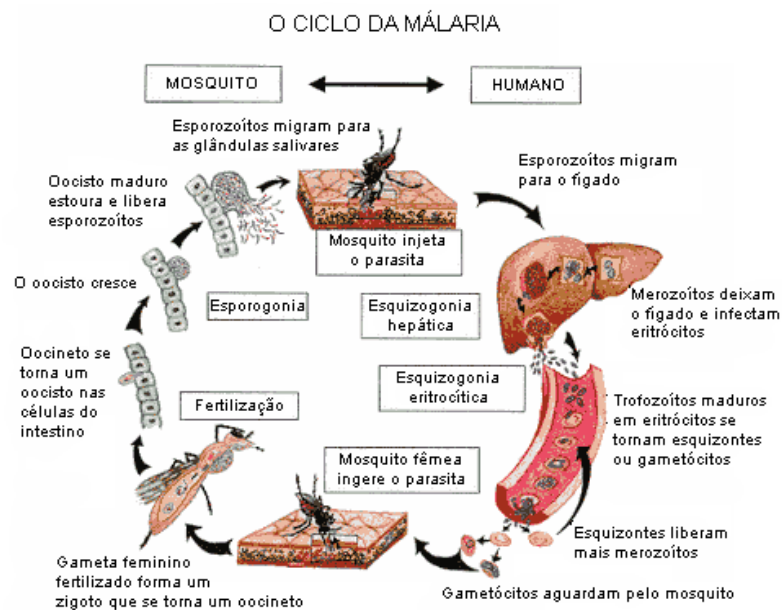
O ciclo de vida do protozoário causador da doença inicia-se pela inoculação de formas esporozoítas após picada de uma fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. A fase pré-eritrocítica, assintomática, é marcada pela infecção de hepatócitos por esporozoítas inoculados a partir da glândula salivar do mosquito. Recentemente, Amino *et al.* (2006), utilizando sistema de microscopia confocal em tempo real, mostraram que somente parte dos esporozoítas inoculados penetra nos capilares sangüíneos, enquanto que outra parte é drenada para os linfonodos mais próximos. Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que após a infecção hepática os parasitas induzem morte celular e são liberados dos hepatócitos por meio de formação de vesículas ricas em parasitas (Thiberge *et al.*, 2007).

Na fase seguinte, eritrocítica, os merozoítos livres aderem e penetram no eritrócito, onde começam a degradar a hemoglobina celular. A hemoglobina é digerida pelo parasita gerando aminoácidos para o seu desenvolvimento. Este processo resulta na produção do grupo heme, que é extremamente tóxico ao *Plasmodium*. O acúmulo do grupo heme pode resultar na inibição das proteases do vacúolo digestivo, interferir na geração de radicais livres e eventualmente pode provocar a lise do parasita. Por esse motivo, para evitar a sua intoxicação, o *Plasmodium* transforma o grupo heme em um polímero insolúvel, inerte e não tóxico (Carney *et al.*, 2006), a hemozoína, através de uma atividade bioquímica específica do parasita (Slater & Cerami, 1992). Após a liberação dos merozoítos pelos eritrócitos, a hemozoína é deixada como um corpo residual e acumula em níveis significativos como pigmento malárico (Martiney *et al.*, 2000).

Nos glóbulos vermelhos inicia-se um processo de divisão assexuada, seguido do desenvolvimento do parasita em vários estágios desde anel, trofozoíta, esquizonte jovem até esquizonte maduro, o qual é responsável pela liberação dos merozoítos na corrente



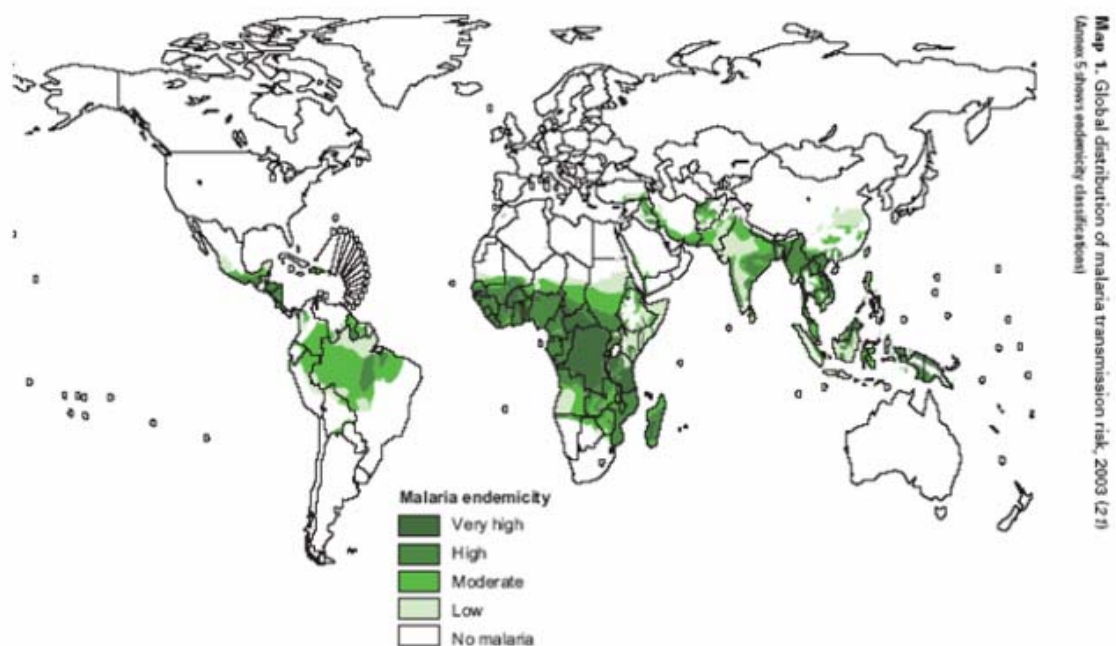
sanguínea, o que dá início a novas invasões dos eritrócitos. Alguns parasitas diferenciam-se em gametócitos femininos e masculinos, que são encontrados principalmente no sangue periférico. Durante o repasto sanguíneo, o mosquito ingere os gametócitos, que migram até o intestino, aonde vão se fundir formando o zigoto, o qual após passar por transformações origina o oocineto. Esta forma penetra na parede das células intestinais, onde se encista na camada epitelial do intestino, passando então a ser chamado de oocisto. O oocisto se divide assexuadamente em inúmeros esporozoítas, até seu rompimento e liberação destes no meio extracelular. Os esporozoítas migram até a glândula salivar, fazendo com que os parasitas sejam eliminados durante o repasto sanguíneo dando a continuidade ao ciclo (Figura 1).



**Figura 1. Ciclo da Malária.** (Adaptado de: [www.who.int](http://www.who.int))

## 2. Malária no contexto mundial

A malária é, mundialmente, um dos maiores e mais antigos desafios da saúde e desenvolvimento da humanidade, e juntamente com o HIV e a tuberculose, é uma das maiores causas globais de morte por doenças infecciosas (Nature Outlook, 2004) e a principal doença parasitária do mundo, causando morbidade e mortalidade nas regiões tropicais e subtropicais em mais de 100 países (Figura 2).



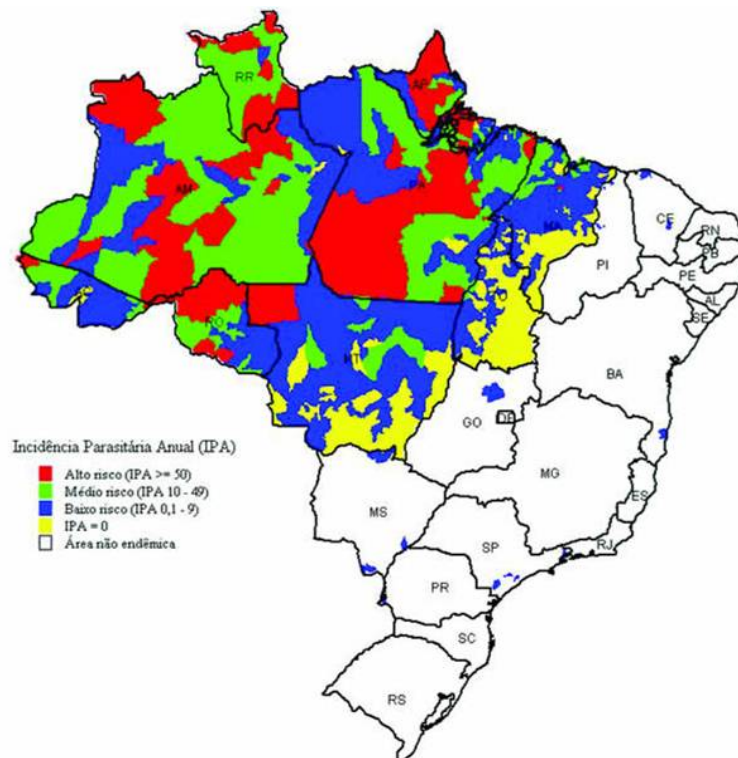
**Figura 2: Mapa da distribuição global do risco de transmissão da malária.**

(Adaptado de: <http://rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm>)

Estima-se que a malária coloque em risco 2,4 bilhões de pessoas, principalmente aquelas expostas à infecção por *P. falciparum* e *P. vivax*, responsáveis por cerca de 100–300 e de 130-435 milhões dos casos anuais respectivamente (WHO, 1997; Mendis *et al.*,

2001; Baird, 2007). Por ano ocorrem cerca 1,5 a 2,7 milhões de mortes, sendo que 80% delas na África Sub-Saariana, acometendo principalmente crianças e mulheres grávidas (Hay *et al.*, 2004). Além das mortes, crianças sobreviventes dos casos de malária severa podem ficar com seqüelas neurológicas irreversíveis, tais como paralisia parcial ou total, perda de funções cognitivas como memória, atenção e dificuldades para falar, podendo permanecer em estado vegetativo (Holding *et al.*, 1999).

Recentemente foi constatado que 40% dos casos reportados nas Américas se referem ao Brasil. No ano de 2005, foram registrados cerca de 600.000 casos de malária, principalmente na região amazônica (Figura 3), sendo aproximadamente 75% registrados por *P. vivax* e 25% por *P. falciparum* (Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS, Ministério da Saúde, 2006).



**Figura. 3:** Áreas de risco de infecções maláricas no Brasil. Fonte: [ww.sucen.sp.gov](http://ww.sucen.sp.gov)

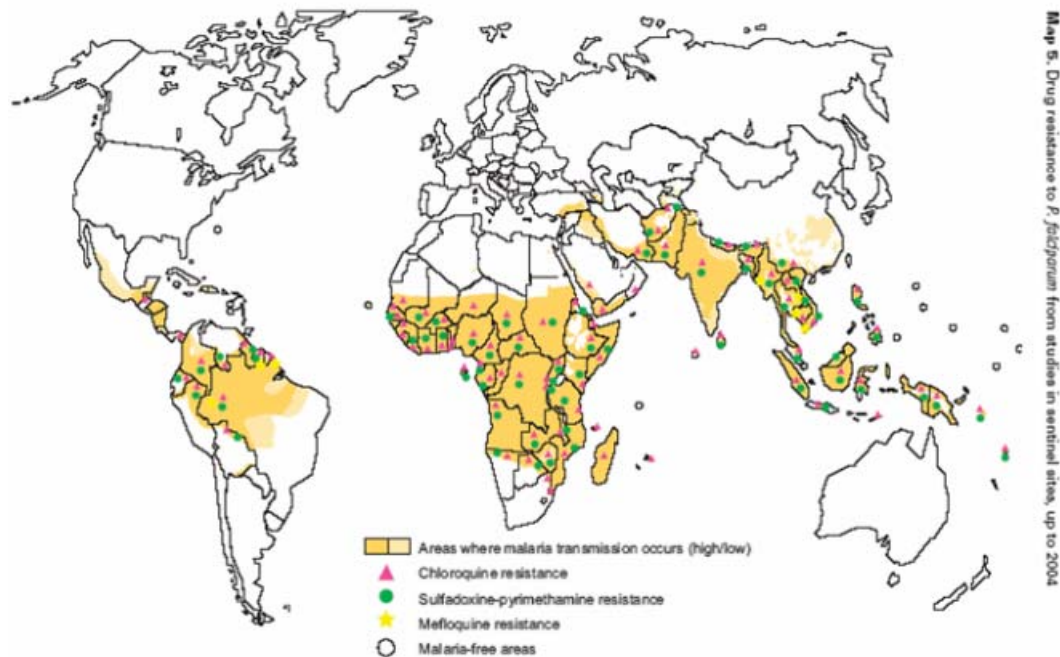
Apesar da maior parte dos casos de malária no Brasil ser devido ao *P. vivax*, nos últimos anos, tem-se notado o crescimento percentual de casos de malária por *P. falciparum*, principalmente nos estados do Amazonas, Maranhão, Pará e Rondônia. Tal incremento é preocupante visto que os casos de malária grave e de óbitos decorrem principalmente de infecções por esta espécie de *Plasmodium* ([http://portalweb05.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be.malaria01\\_2005.pdf](http://portalweb05.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be.malaria01_2005.pdf)).

Além disso, tem-se observado, que em algumas infecções por *P. vivax* a doença pode evoluir para casos graves semelhantes aos que ocorrem em *P. falciparum*. Neste sentido, já foi descrita a deposição de pigmento malárico em placentas oriundas de mulheres infectadas por *P. vivax* (McGready *et al.*, 2004), aspecto característico de malária grave em mulheres grávidas infectadas por *P. falciparum* (Duffy & Fried, 2005). Recentemente, além das complicações relatadas em mulheres grávidas, estudos de casos de indivíduos com malária *vivax* originários de diferentes países endêmicos fora da África Sub-Saariana foram capazes de diagnosticar trombocitopenia severa, malária cerebral e síndrome respiratória aguda (Makkar *et al.*, 2002; Ozen *et al.*, 2006; Lomar *et al.*, 2005).

### **3. A problemática**

Durante décadas, a malária vem sendo alvo de intensas campanhas com o objetivo de erradicar a transmissão do parasita por meio de inseticidas e quimioterapia. No entanto, essas estratégias não têm sido muito eficazes devido ao surgimento de cepas de parasitas resistentes às drogas convencionalmente usadas, tais como cloroquina, mefloquina, quinino e sulfadoxina-pirimetamina (Wernsdorfer & Payne, 1991; Le Bras & Durand, 2003) (Figura 4). Além disso, não existe nenhuma vacina antimalárica comercial e até então, nenhum estudo com vacina antimalárica obteve sucesso (Hoffman, 2006).





**Figura 4. Mapa de distribuição global de resistência a drogas antimaláricas.**

(Adaptado de: <http://rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm>)

O extensivo uso da cloroquina (CQ) nos últimos 50 anos propiciou uma enorme pressão seletiva para o desenvolvimento de mecanismos de resistência às formas sanguíneas do parasita. Em 1977, a CQ foi substituída pela sulfadoxina-pirimetamina (SP). Entretanto, a resistência a SP também aumentou desde os fins dos anos 80, especialmente na África Oriental, onde havia sendo utilizada em grande escala como medicamento de primeira linha, e em certas áreas da África Ocidental (Onyiorah *et al.*, 1996; Trigg *et al.*, 1997; Ogutu *et al.*, 2000). Em 1980, depois destas duas drogas (CQ e SP) terem sido consideradas ineficientes, os pacientes com malária *falciparum* passaram a ser tratados com quinino (QN). No entanto, a resistência ao QN foi constatada logo após a sua introdução e em 1981 foi iniciado um tratamento combinado com quinino e tetraciclina (Trigg &

Kondrachine, 1998). Todavia, um dos problemas associados a esta combinação de drogas era a necessidade de longos períodos de tratamento para a completa eliminação do parasita, dificultando o monitoramento do tratamento. Sendo assim, em 1984, foi introduzido um regime de tratamento a base de mefloquina (MQ) administrada em dose única. Entretanto, nos anos 90, casos de resistência a MQ começaram a ser constatadas na Tailândia, principalmente nas áreas de fronteira com o Camboja e o Vietnã (Nosten *et al.*, 2000). Nesta região do sudeste asiático a única forma de combate ao parasita é o tratamento a base de artemisininas (Trigg & Kondrachine, 1998) (Figura 5).



**Figura 5. Mapa da distribuição global do uso de tratamento combinado a base de artemisinina (ACT).**

(Adaptado de: <http://rbm.who.int/wmr2005/html/map1.htm>)

O uso da terapia combinada à base de artemisinina (ACT) é recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) desde 2001 (WHO, 2001), e há um forte consenso de que ACT deve ser de primeira escolha no tratamento combinado da malária (Ittarat *et al.*, 2003; Olliaro, 2005). No entanto, ACT é um tratamento mais caro que os outros regulares e, além disso, a disponibilidade de grandes volumes de artemisinina não é possível ainda (Dondorp *et al.*, 2004; Mutabingwa, 2005).

Apesar do uso terapêutico de formulações contendo artemisininas ser recomendado pela OMS, recentemente, foi verificado aumento nas mutações de genes alvos das artemisininas, como o SERCA PfATPase6 (sarco/endoplasmic reticulum calcium dependent ATPase) em populações de áreas onde se faz uso descontrolado de seus derivados (Jambou *et al.*, 2005). Mais ainda, foi recentemente publicado um estudo que demonstra o crescimento de *Plasmodium murino* (*Plasmodium chabaudi chabaudi*) mesmo na presença de concentrações crescentes de artemisinina. Além disto, esta resistência se manteve estável após clonagem, congelamento, repiques sem a droga, e transmissão por mosquitos (Afonso *et al.*, 2006).

A epidemiologia da resistência em *P. vivax* é menos estudada, mas sua resistência a CQ é significativa em algumas partes da Indonésia, Papua Nova Guiné e áreas adjacentes. Já a resistência desta espécie de *Plasmodium* a SP é bastante difundida (Baird, 2004).

O surgimento da resistência, especialmente em *P. falciparum*, foi a maior contribuição para a ressurgência global da malária nas últimas décadas (White, 2004). Além disso, o problema está se agravando devido à deterioração das condições sócio-econômicas das regiões rurais em países endêmicos, contribuindo para o reaparecimento de epidemias em áreas onde a malária já tinha sido erradicada.

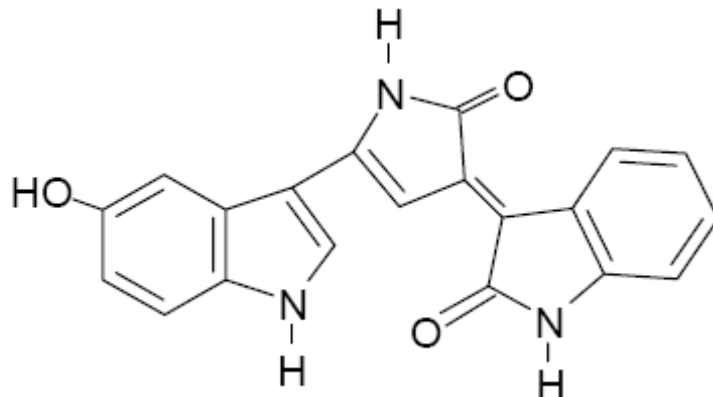
Os eventos genéticos que conferem resistência aos antimaláricos são espontâneos e raros, sendo traduzidos por mutações ou mudanças na cópia do número de genes relativos ao transporte da droga ao interior do parasita (Rathod *et al.*, 1997). Assim, quanto maior a meia-vida da droga, ou seja, quanto mais lenta sua exposição ao parasita, maior a probabilidade de novos parasitas apresentarem seleção a ela. Portanto, em áreas endêmicas, repetidas exposições da população de parasitas a concentrações de drogas residuais devido à lenta eliminação são uma importante fonte de resistência (Bloland *et al.*, 2000).

Previendo o surgimento e a expansão da resistência aos antimaláricos convencionais é de grande importância planejar novas formas de controle da malária. O aparecimento constante de cepas resistentes às mais diversas classes de antimaláricos nos direciona a propor estratégias capazes de retardar o surgimento da resistência através da obtenção de novos compostos antimaláricos. No caso particular do *P. vivax*, no qual apenas uma droga comercialmente disponível, a primaquina, é capaz de eliminar os estágios hipnozoítas latentes nos hepatócitos a descoberta de novas formulações contra estes estágios também é necessária. Recentemente, um estudo demonstrou elevada atividade de tazopsina, um composto semi-sintético, contra as formas hepáticas de *P. falciparum* e *P. yoelli* em cultura (Carraz *et al.*, 2006).

#### **4. A Violaceína**

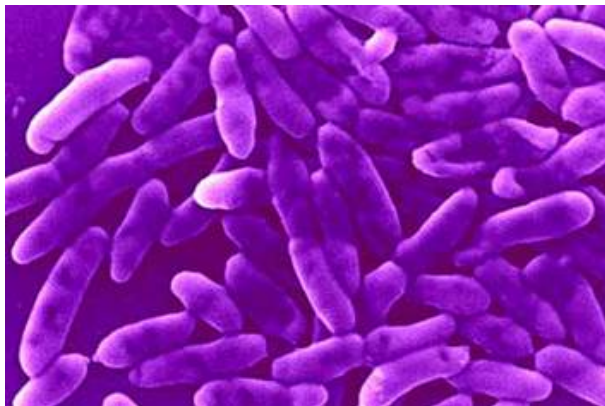
A violaceína (Figura 6) é o principal pigmento produzido pela bactéria *Chromobacterium violaceum*. A primeira descrição documentada sobre a bactéria e seu pigmento foi feita pelo italiano Curzio Bergonzini em 1881, porém a fórmula química e a estrutura exata da violaceína só foram determinadas em 1958-1960 (Ballantine *et al.*,

1960). A violaceína é um derivado indólico caracterizado como 3(1,2- dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona.



**Figura 6. Estrutura molecular da violaceína.**

A *Chromobacterium violaceum* (Figura 7) é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Neisseriaceae e à classe das  $\beta$ -proteobactérias, é anaeróbia facultativa em forma de bastonetes (Durán & Menck, 2001). Trata-se de uma bactéria saprófita amplamente distribuída, podendo ser encontrada em águas e solos de regiões tropicais e subtropicais do Brasil onde constitui um componente minoritário da microbiota total. Seu genoma foi seqüenciado por um Consórcio Brasileiro em 2003, e revelou diversas vias alternativas para a geração de energia, complexos, extensivos sistemas de adaptação ao estresse, amplo uso de *quorum sensing* a fim de aumentar a versatilidade e adaptabilidade do organismo (Brazilian National Genome Project Consortium).



**Figura 7. Eletromicrografia de *Chromobacterium violaceum*. Fonte: Ciência hoje.**

A partir do estabelecimento da cepa CCT 3496 da *Chromobacterium violaceum*, a produção, extração e purificação do pigmento foram otimizadas e estudos de sua biossíntese, bem como reações de bio-transformação foram realizadas (Durán & Haun, 1997; Rettori & Durán, 1998; Bromberg, 2000; Bromberg & Durán, 2001).

Diversos trabalhos atribuíram à violaceína diferentes atividades biológicas tais como bactericida (Lichstein & Van de Sand, 1946; Durán *et al.*, 1983), antiviral (May *et al.*, 1991; Andrighetti-Frohner *et al.*, 2003), antioxidante (Rettori *et al.*, 1998), antimicobacteriana (De Souza *et al.*, 1999), fungicida (Shirata *et al.*, 2000), anti-ulcerogênica (Durán *et al.*, 2003) e antitumoral (Melo *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2003; Saraiva *et al.*, 2004).

Seu potencial antibiótico foi sugerido ao notar-se que nas lesões na pele causadas por essa bactéria, nenhum outro organismo contaminante era encontrado. Um estudo com 51 linhagens de bactérias, totalizando 21 espécies, mostrou que a violaceína apresenta um notável efeito inibitório no crescimento de bactérias Gram positivas, mas pequeno em

Gram negativas (Lichstein & Van de Sand, 1945). Posteriormente foi demonstrada atividade antibacteriana *in vitro* em ambos os grupos (Durán, 1990; Durán *et al.*, 1983).

Em ensaios de determinação de citotoxicidade para diferentes marcadores celulares (multi-endpoint) utilizando fibroblastos V79 de pulmão de hamster chinês, a violaceína demonstrou um potencial citotóxico com valores de  $IC_{50}$  (concentração inibitória responsável por 50% de morte celular) de 5-12  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A investigação da habilidade da violaceína de induzir apoptose em cultura de células V79 foi demonstrada pelo método de TUNEL e pela reação de Feulgen acoplada à análise por imagem (Haun *et al.*, 1992; Melo *et al.*, 2000, 2003).

Recentemente, estudo conduzido em células de leucemia mielóide humana demonstrou que o composto é capaz de mediar a apoptose via ativação específica do receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1), e que sua citotoxicidade é precedida pela ativação da caspase-8, dos genes de transcrição NF $\kappa$ B e da ativação da p38 MAP quinase (Ferreira *et al.*, 2004). Além dos estudos em células leucêmicas, o potencial citotóxico da violaceína também foi demonstrado em linhagens de células de câncer de cólon (De Carvalho *et al.* 2006; Kovach *et al.*, 2006). Neste sentido, De Carvalho *et al.* (2006) demonstraram que o estresse oxidativo induzido pela violaceína é um dos mediadores dos níveis de apoptose em células Caco-2 do cólon intestinal.

Efeitos moderados da violaceína também foram observados contra protozoários patogênicos. Em ensaios para medir sua atividade contra *Trypanosoma cruzi* a violaceína apresentou ação similar ao Nifurtimox, um importante quimioterápico utilizado no tratamento da doença de Chagas (Durán *et al.*, 1998; Durán & Menck, 2001). No entanto, seu potencial quimioterápico *in vivo* foi extremamente baixo (Haun *et al.*, 1992).

Além de atividade tripanossomicida, estudos de Leon *et al.* (2001) mostraram que a violaceína também apresenta atividade contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*, apesar de apresentar-se dez vezes menos ativa que a pentamidina, uma das drogas mais utilizadas no tratamento de leishmanioses. Além disto, neste estudo (Leon *et al.*, 2001) não foi avaliado o potencial deste composto na célula hospedeira (macrófagos) alvo do parasita, e nem nos modelos murinos das leishmanioses.



*Objetivos*

## **1. Objetivo geral:**

Baseado nas propriedades quimioterápicas da violaceína, livre e formulada, contra células tumorais, bactérias, fungos e, principalmente, contra protozoários patogênicos ao homem, este projeto visa avaliar a capacidade quimioterápica *in vivo* e *in vitro* deste composto no combate de formas sangüíneas de *Plasmodium* spp..

## **2. Objetivos específicos**

### **2.1 Análise *in vitro***

2.1.1 Avaliar a capacidade da violaceína em inibir o desenvolvimento de *P. falciparum* 3D7.

2.1.2 Comparar o efeito antimalárico da violaceína contra formas sangüíneas de *P. falciparum* 3D7 com outras drogas, como cloroquina e quinino.

2.1.3 Avaliar o efeito da violaceína nos diferentes estágios de desenvolvimento de *P. falciparum* (formas jovens e maduras).

### **2.2 Análise *in vivo***

2.2.1 Avaliar a capacidade da violaceína em inibir o desenvolvimento de *PcchAS*.

2.2.2 Avaliar a evolução dos fenômenos fisiopatológicos nos animais infectados tratados em comparação aos não tratados, através da análise da parasitemia, densidade de eritrócitos e alterações morfológicas no baço e fígado.

2.2.3 Comparar o efeito antimalárico da violaceína, *in vivo*, com diferentes drogas convencionalmente utilizadas no tratamento da malária, como cloroquina e artesunato.

2.2.4 Avaliar a capacidade da violaceína em reduzir a taxa de mortalidade em animais infectados com *PcchAJ*.

2.25 Avaliar os efeitos tóxicos da violaceína em animais não infectados, considerando-se o peso, a densidade de eritrócitos e alterações morfológicas no baço e fígado.

*Metodologia*

## 1. Purificação da violaceína

A violaceína (3-(1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ylidene)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one) foi isolada a partir de *Chromobacterium violaceum* (CCT3496) como descrito previamente (Rettori & Durán, 1998). Através da purificação com clorofórmio, a parede celular e os resíduos da membrana foram extraídos, e usando éter dietil e posteriormente etanol, foi obtido um extrato contendo a violaceína. Após a evaporação do etanol, a violaceína foi purificada por cristalização (metanol/água) seguida de HPLC. Dimetil sulfóxido (DMSO) foi utilizado para dissolver a violaceína devido sua pobre solubilidade em água. Todo esse procedimento de obtenção e purificação da violaceína foi realizado em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Nelson Duran (Instituto de Química, Unicamp). Como a violaceína é um produto derivado de bactéria, avaliamos se havia resíduos de lipopolissacarídeo (LPS) presente nas amostras purificadas da violaceína. Para isso, utilizou-se o kit Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000® (Cambrex) e os procedimentos foram feitos de acordo com o protocolo do produto. Não foi detectada a presença de LPS em nenhum os lotes utilizados.

## 2. Análise *in vitro*

### 2.1 Cultivo de *Plasmodium falciparum*

*P. falciparum* 3D7 foi cultivado em meio RPMI completo (RPMI – Sigma, USA), suplementado com 10% de plasma humano através do método de *candle jar* (Trager & Jansen, 1976). O hematócrito final foi ajustado a 4% com eritrócitos sadios O+ fornecidos pelo banco de sangue da UNICAMP.

## 2.2 Sincronização de *P. falciparum*

Para alguns ensaios *in vitro*, os parasitas foram sincronizados em Sorbitol como descrito em Schlichtherle *et al.* (2000). Resumidamente, o pellet de eritrócitos infectados com a parasitemia maior que 5%, sendo a maioria das formas no estágio de anel, foi ressuspenso em uma solução 5% de Sorbitol (J.T.Baker, USA). Após 5 minutos em temperatura ambiente, o pellet foi lavado duas vezes em meio completo e a cultura foi retomada. O ensaio foi repetido pelo menos uma vez para assegurar a sincronização do parasita.

## 2.3 Atividade antimalárica

A atividade da droga foi determinada como descrito em Schlichtherle *et al.* (2000), sendo que o crescimento parasitário foi medido através da incorporação da [<sup>3</sup>H] Hipoxantina, essencial na replicação parasitária (purina). Os ensaios foram feitos em placas de cultura de 96 poço com o volume final de 200 µL sendo 100 µL de meio RPMI completo suplementado com 10% de plasma humano com diferentes concentrações das drogas testadas (violaceína, quinino e cloroquina) ou sem droga (controle) e 100 µL de suspensão de EI por *P. falciparum* (2% hematócrito final e 1% parasitemia). Como a violaceína está dissolvida em DMSO, na concentração máxima de 0.25%, essa quantidade de DMSO foi adicionada ao meio completo nos respectivos controles. Após 30 horas de incubação a 37°C em *candle jar*, 50 µL de meio completo contendo 10 µCi [<sup>3</sup>H] Hipoxantina foi adicionado a cada poço. Após 18 horas a 37°C em *candle jar*, os eritrócitos foram lisados com o auxílio de Cell Harvester semi automático (Skatron) em filtros de papel (Millipore). Após secos, os filtros foram revelados em um líquido de cintilação (2, 5 Diphenyl oxazole- Sigma, USA - diluído em Toluol - Merck). A leitura da radiotividade

(CPM) se deu em um cintilador Beta (Beckman 56000TA). Também se incubou eritrócitos sadios nas mesmas condições anteriores e a radioatividade foi determinada e usada como branco. Cada concentração das drogas foi testada em triplicata, e pelo menos três ensaios diferentes foram feitos utilizando-se diferentes amostras das drogas. O crescimento parasitário foi comparado com o controle (ausência de droga), representando 100% de crescimento parasitário. A inibição do crescimento parasitário foi calculada de acordo com a fórmula: % Inibição =  $100 - [(CPM \text{ amostra} - CPM \text{ Eritrócitos sadios} / CPM \text{ Controle} - CPM \text{ Eritrócitos sadios}) \times 100]$ . A eficácia das drogas foi determinada comparando-se a concentração do composto que inibe 50% do desenvolvimento parasitário (IC<sub>50</sub>). A IC<sub>50</sub> foi calculada através de um gráfico do Log das doses verso inibição (expresso em porcentagem em relação ao controle).

Para os experimentos envolvendo parasitas sincronizados, realizou-se somente uma incubação a 37°C por 18 horas na presença de 10 µCi [<sup>3</sup>H] Hipoxantina.

### **3. Análise *in vivo***

#### **3.1 Animais e parasita**

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 de 7 a 10 semanas de vida provenientes do Centro de Bioterismo (CEMIB) - UNICAMP. Os animais foram mantidos em condições *Germ-Free* e todos os procedimentos foram analisados de acordo com o comitê de ética em experimentação animal desta instituição (CEEAA/UNICAMP) (protocolo nº 985-1).

Duas linhagens de *Plasmodium* foram testadas: PcchAS (PcchAS) e PcchAJ, cedidos gentilmente, respectivamente, pelos professores Dr. Hernando Del Portillo (Departamento de Parasitologia, ICB, USP, São Paulo, SP, Brasil) e Dr. Maria Regina d'Imperio (Departamento de Imunologia, ICB, USP, São Paulo, SP, Brasil).

As formas sanguíneas dos dois parasitas foram coletadas de animais doadores (C57BL/6) previamente infectados com 100 µL de pellet de eritrócitos infectados mantidos em criotubos a -80°C; de acordo com o protocolo descrito por Engwerda *et al.* (2005). Os animais foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com 10<sup>6</sup> eritrócitos infectados (EI).

### **3.2 Análise dos Sintomas Clínicos.**

Com o intuito de avaliar possíveis alterações nos sintomas clínicos dos animais infectados tratados, ou não, com as diferentes doses de violaceína, analisamos a parasitemia e a variação na quantidade de eritrócitos totais ao longo da infecção dos diferentes grupos de animais.

#### **3.2.1 Parasitemia**

A parasitemia foi determinada diariamente por meio de esfregaços de sangue obtido da cauda do animal a partir do dia 3 pós-infecção até a morte do animal ou a cronificação da doença na qual é observada uma baixa quantidade de parasitas nos esfregaços (menor que 1%). Os esfregaços foram fixados e corados através do kit Panótico Rápido (Laborclin). A porcentagem de parasitemia foi determinada calculando-se o número de EI em 1.000 eritrócitos.



### 3.2.2 Densidade de eritrócitos

Diariamente, determinou-se a densidade de glóbulos vermelhos de cada animal, através da retirada de 10 uL de sangue da cauda do animal, diluição em PBS com heparina e contagem em Câmara de Neubauer. O valor diário encontrado para cada animal foi dividido pelo valor desse mesmo animal no dia 0 da infecção, obtendo-se assim a densidade relativa (Número de eritrócitos por mL de animal num determinado dia pós-infecção / Número de eritrócitos por mL do mesmo animal no dia 0).

## 3.3 Atividade antimalárica

### 3.3.1 PcchAS (Tratamento a partir do dia 0)

Para a análise da atividade antimalárica da violaceína *in vivo*, grupos de 7 a 10 camundongos foram infectados, via intraperitoneal (i.p.), com  $10^6$  hemácias parasitadas por PcchAS. Os camundongos foram tratados diariamente com 100 µL de diferentes doses de droga (7,5; 3,75; 0,75 e 0,075 mg/kg de violaceína ou salina) durante 11 dias consecutivos (dia 0-10 pós-infecção) por via i.p.. A primeira administração da droga foi efetuada 1 hora após a infecção, as administrações sucessivas ocorreram 24 horas após a anterior. O DMSO, usado para solubilizar a droga não ultrapassou 1.25%, sendo que o grupo controle recebeu essa mesma concentração diluída em salina.

Nesse tratamento acompanhou-se a parasitemia até dia 22 pós-infecção a fim de avaliar se haveria recrudescência parasitária, uma vez que o tratamento se encerra no dia 10 pós-infecção.

### **3.3.2 PcchAS (Tratamento a partir do dia 5)**

Para verificar se o tratamento teria eficácia se iniciasse após o estabelecimento da infecção, ou seja, já com a infecção patente, camundongos infectados com  $10^6$  EI por PcchAS foram tratados diariamente a partir do dia 5 pós-infecção (5-10) com 100  $\mu$ L de 7,5 mg/kg de violaceína ou DMSO 1,25% em salina.

### **3.3.3 PcchAJ (Tratamento a partir do dia 0)**

A fim de avaliar se a violaceína teria efeito protetor na mortalidade, camundongos foram infectados com  $10^6$  EI por PcchAJ, uma cepa letal. Esses animais foram tratados diariamente com 100  $\mu$ L de 7,5 mg/kg de violaceína ou DMSO 1,25% em salina durante 11 dias consecutivos (dia 0-10 pós infecção) e foram monitorados diariamente quanto a sobrevivência.

### **3.3.4 Determinação do ED<sub>50</sub>**

O ED<sub>50</sub>, dose capaz de inibir 50% o crescimento do parasita em relação ao controle, foi calculado baseado em um gráfico: Log das doses verso atividade (expresso em porcentagem em relação ao controle) no dia de pico (dia 7). Também foi determinado o ED<sub>50</sub> do artesunato e da cloroquina, sendo que as condições de tratamento foram semelhantes as da violaceína, ou seja, os camundongos foram tratados diariamente com 100  $\mu$ L de diferentes doses da droga ou salina durante 11 dias consecutivos (dia 0-10 pós infecção) por via i.p..

### 3.4 Histologia

Foram coletados o fígado e o baço de seis animais infectados com *P.c. chabaudi* AS no dia 7 pós-infecção (dia de pico parasitário), três desses tratados com 7.5 mg/kg de violaceína e três tratados com 1,25% DMSO (controle) a fim de verificar se havia diferença entre os dois grupos nos cortes histológicos desses órgãos. Após a fixação dos órgãos por 24 horas em formol 4%, os órgãos foram gradualmente desidratados em soluções de etanol de diferentes concentrações (70-100%). Então foram embebidos em xilol para depois finalmente serem emblocados em parafina. Foram obtidos cortes de 5.0 µm que foram corados com hematoxilina-eosina (HE), montados e utilizados para fazer a análise histológica.

### 3.5 Toxicidade da violaceína

A toxicidade da violaceína foi avaliada através da análise diária da densidade de eritrócitos e massa corpórea de camundongos C57BL/6 injetados i.p. com a maior dose de violaceína (7,5 mg/kg) durante 11 dias consecutivos, ou apenas com solução salina (controle). A densidade de eritrócitos foi calculada como descrito anteriormente e a massa corpórea foi calculada de acordo com a fórmula:  $[(\text{peso do animal em determinado dia de tratamento} / \text{peso do animal no dia anterior ao tratamento}) \times 100]$ .

Também foram coletados baços e fígados de seis animais para verificar se havia alterações morfológicas nesses órgãos, sendo três tratados com 7.5 mg/kg de violaceína e três inoculados com solução salina. Esses órgãos foram processados e corados como descrito anteriormente.

### **3.6 Análise estatística**

A análise estatística entre tratado e não tratado foi determinado por ANOVA one way para comparações da parasitemia e da densidade de glóbulos vermelhos. Enquanto o teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar os ED<sub>50</sub> e IC<sub>50</sub> das diferentes drogas usadas. As diferenças entre as taxas de letalidade foram analisadas pelo teste de Log-Rank. Todas as análises estatísticas foram efetuadas com o auxílio do software BioEstat™ version 3.0 e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

## *Resultados*

### 1. Atividade *in vitro* anti-malária da violaceína

Baseado nas atividades da violaceína contra protozoários patogênicos, avaliou-se o potencial da violaceína diretamente contra EI por *P. falciparum*. Primariamente, a fim de determinar a concentração da droga que não tivesse ação contra eritrócitos sadios, incubaram-se eritrócitos não infectados com diferentes concentrações (500 a 14.000 nM) de violaceína. Após 48 horas de incubação a 37°C em *candle jar*, a densidade de eritrócitos, relativo à hora 0, foi determinada. Como se pode ver na Figura 8, concentrações acima de 10.000 nM são tóxicas as hemácias sadias.

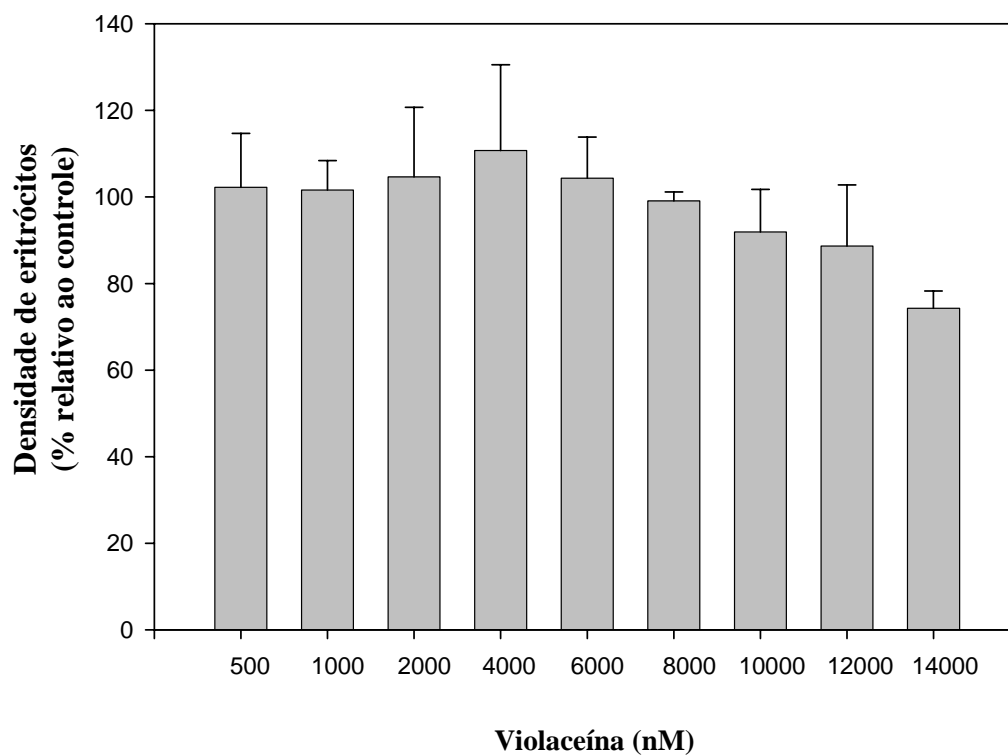
Posteriormente, avaliou-se o efeito anti-plasmodial da violaceína contra formas sanguíneas de *P. falciparum*. Testamos concentrações entre 31,25 nM até 8000 nM, uma vez que essa concentração mostrou não ter efeito sob os eritrócitos sadios. Após 48 horas de incubação a 37°C em *candle jar*, determinamos a inibição do desenvolvimento parasitário através da incorporação da [<sup>3</sup>H] Hipoxantina. De acordo com a Figura 9, a violaceína inibe o desenvolvimento parasitário a partir de 62.5 nM e elimina completamente o parasita em concentrações acima de 500 nM.

A fim de comparar a atividade da violaceína com outras drogas antimaláricas já utilizadas, realizaram-se ensaios de inibição do desenvolvimento parasitário através da incorporação de [<sup>3</sup>H] hipoxantina com a cloroquina e quinino. Para isso incubaram-se por 48 horas a 37°C em *candle jar* diferentes concentrações de ambas as drogas com EI por *P. falciparum* (Figura 10 e 11).

A comparação dos valores de IC<sub>50</sub> obtidos revelou que a violaceína (106.99 ± 12.01 nM) foi tão eficaz quanto o quinino (91.53 ± 17.14 nM), uma vez que não houve diferença significativa ( $P > 0.05$ ) entre os valores encontrados. No entanto a violaceína foi 3 vezes

menos eficiente que a cloroquina ( $30.82 \pm 0.88$  nM,  $P < 0.05$ ) em inibir o desenvolvimento parasitário ( $P < 0.05$ ) (Tabela 1).

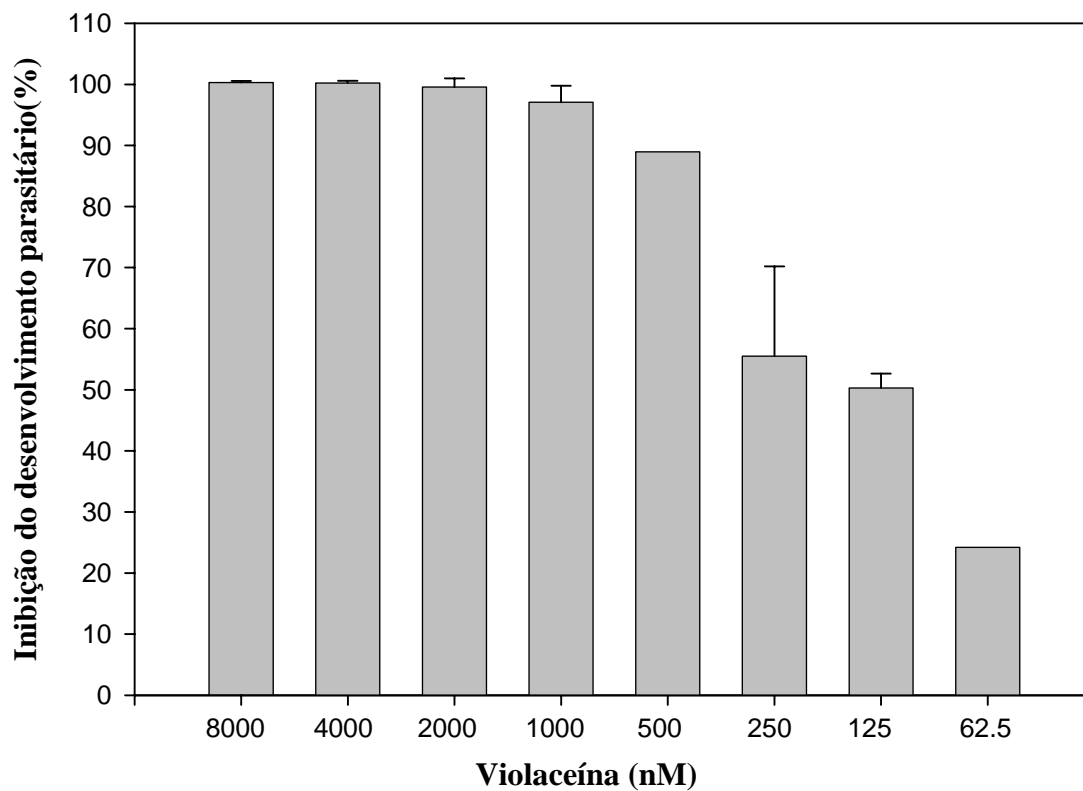
Para avaliar se o efeito da violaceína era similar nos diferentes estágios sanguíneos de *P. falciparum*, os parasitas foram sincronizados através de incubação com Sorbitol e posteriormente colocados em cultura com diferentes concentrações de violaceína. Neste sentido, incubamos somente formas jovens (anel e trofozoíta jovem, 0-18 h do ciclo) ou então formas maduras (trofozoíta maduro e esquizonte, 24-42 h do ciclo) de *P. falciparum* com diferentes concentrações de violaceína. O ensaio teve duração de 18 horas e a incorporação de [ $H^3$ ] Hipoxantina foi medida. Como podemos observar na Figura 12, a violaceína foi eficaz contra parasitas em ambos os estágios sanguíneos e nenhuma diferença estatística foi obtida.



**Figura 8. Efeito tóxico da violaceína sob eritrócitos sadios.**

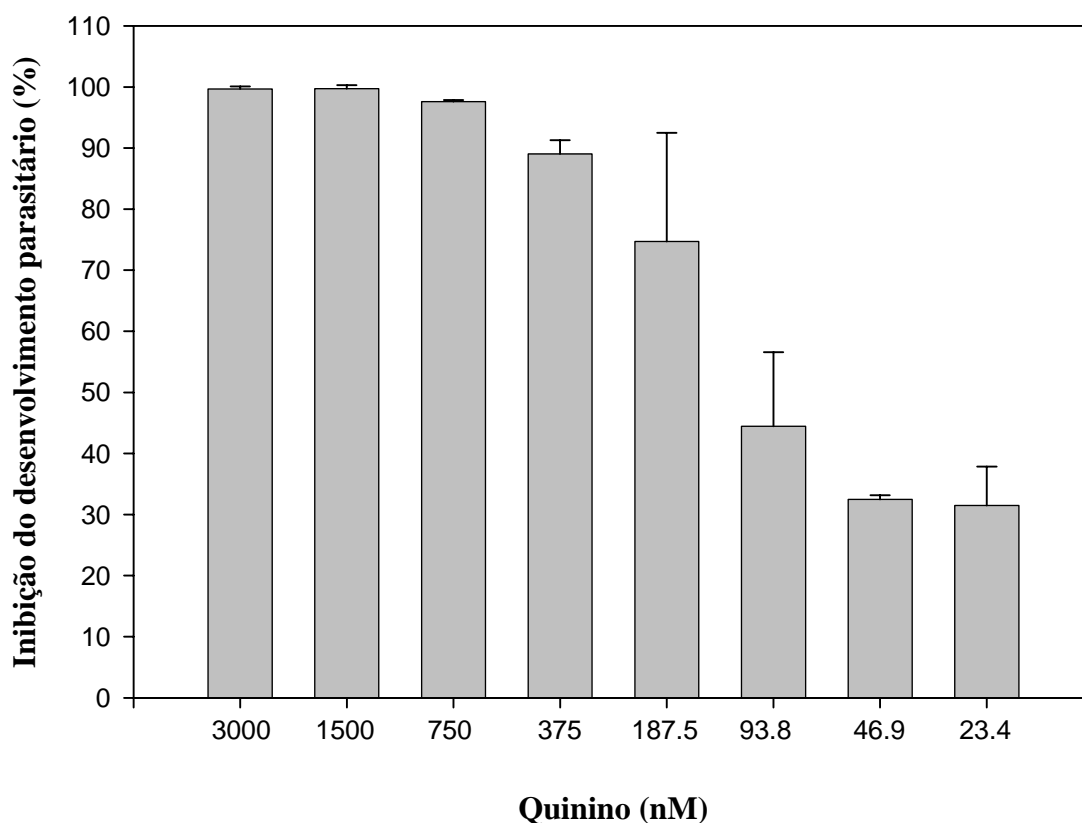
Eritrócitos sadios foram cultivados durante 48 horas na presença de diferentes concentrações de violaceína e sua destruição foi avaliada em relação ao controle, eritrócitos sadios cultivados na presença de 0.25% de DMSO. Os resultados estão expressos como a média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão.





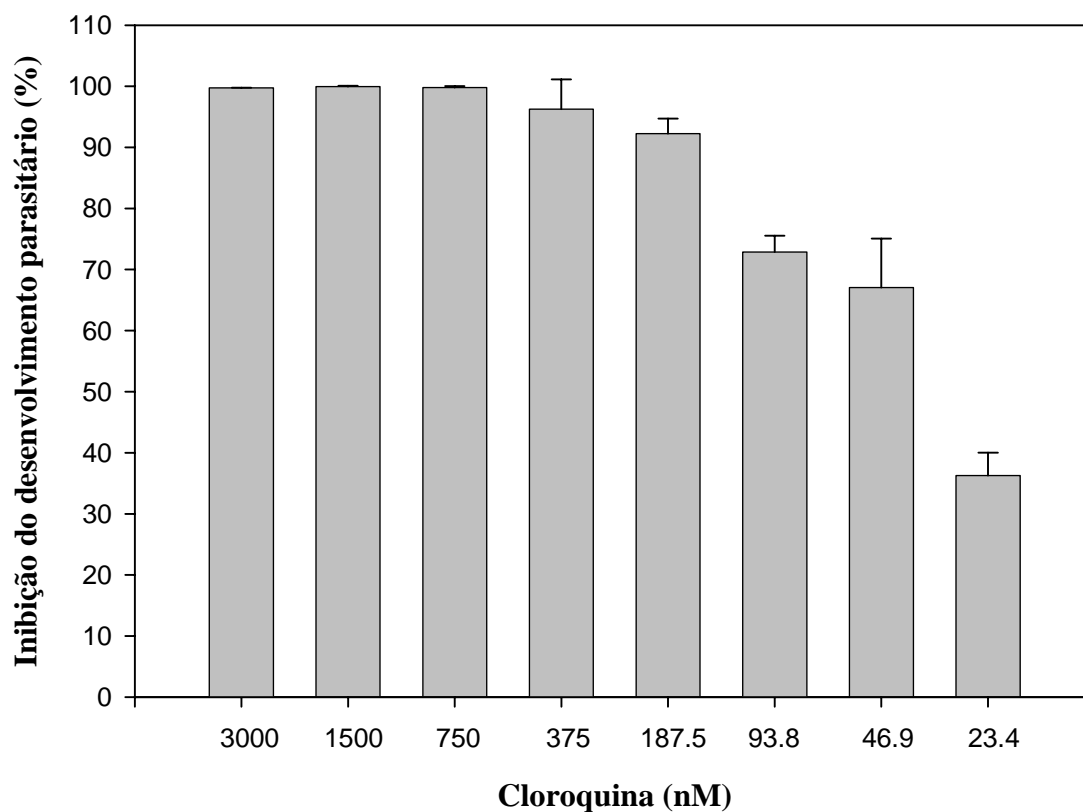
**Figura 9.** Atividade anti-plasmodial da violaceína sob formas sanguíneas de *P. falciparum*.

A inibição da parasitemia de eritrócitos infectados por *P. falciparum* 3D7 (1.0% parasitemia inicial, 2.0% hematócrito) foi determinada após incubação por 48 horas a 37°C em *candle jar* na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de violaceína. Os resultados estão expressos como a média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão.



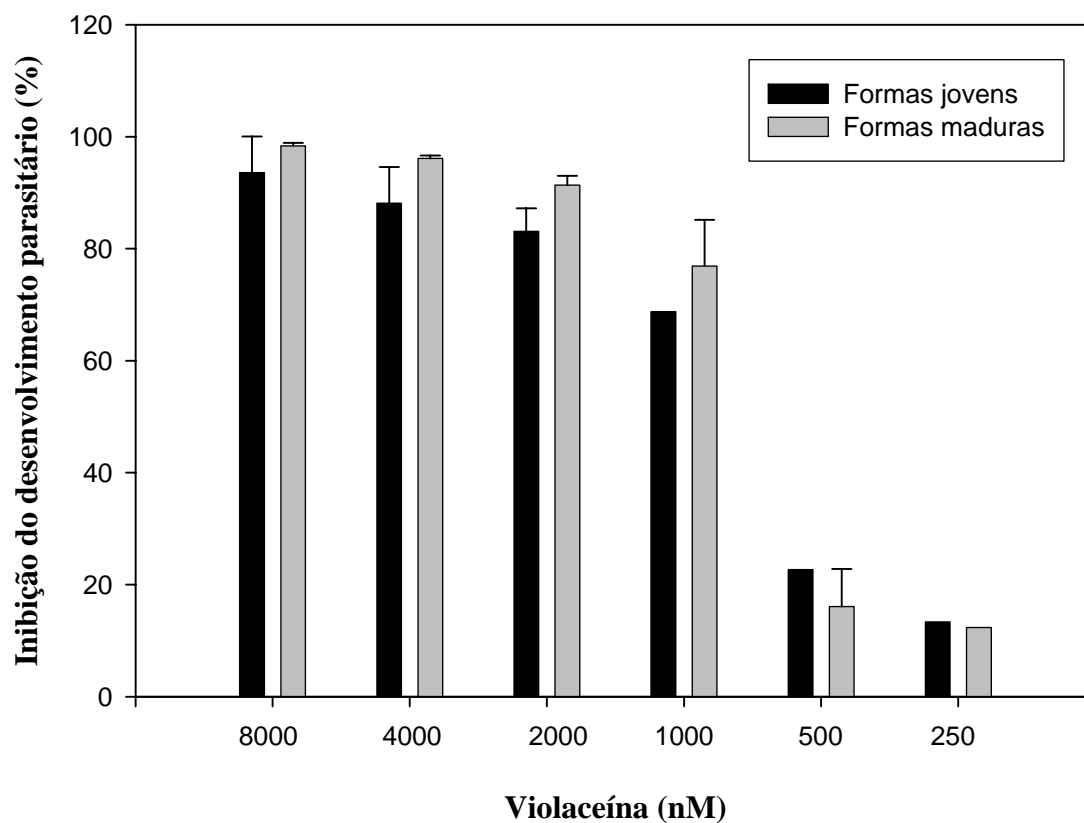
**Figura 10. Atividade anti-plasmodial do quinino sob formas sanguíneas de *P. falciparum*.**

A inibição da parasitemia de eritrócitos infectados por *P. falciparum* 3D7 (1.0% parasitemia inicial, 2.0% hematócrito) foi determinada após incubação por 48 horas a 37°C em *candle jar* na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de quinino. Os resultados estão expressos como a média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 11.** Atividade anti-plasmodial da cloroquina sob formas sanguíneas de *P. falciparum*.

A inibição da parasitemia de eritrócitos infectados por *P. falciparum* 3D7 (1.0% parasitemia inicial, 2.0% hematócrito) foi determinada após incubação por 48 horas a 37°C em candle jar na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de cloroquina. Os resultados estão expressos como a média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 12. Atividade da violaceína sob diferentes estágios sanguíneos do parasita, sob formas jovens e formas maduras.**

Os parasitas foram previamente sincronizados com 5% Sorbitol e a inibição do desenvolvimento parasitário foi determinada após incubação das formas sincronizadas por 18 horas a 37°C em candle jar na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de violaceína. Os resultados estão expressos como a média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão.

**Tabela 1. Comparação da atividade de diferentes antimaláricos sob formas sanguíneas de *P. falciparum* 3D7.**

	<u>IC 50 <sup>a</sup> (nM)) ± SD <sup>b</sup></u>	<u>Significância <sup>c</sup></u>
Violaceína	106.99 ± 12.01	-----
Cloroquina	30.82 ± 0.88	<i>P</i> < 0.05
Quinino	91.53 ± 17.15	NS

<sup>a</sup> IC 50, a concentração necessária para reduzir a parasitemia em 50% em relação ao controle, foi avaliada com base em um gráfico do Log concentração *versus* a inibição do desenvolvimento parasitário.

<sup>b</sup> Média e desvio padrão dos valores de IC <sub>50</sub> de 3 experimentos independentes, utilizando diferentes estoques da droga.

<sup>c</sup> Análise estatística, teste Mann Whitney, entre os valores de IC <sub>50</sub> das diferentes drogas cloroquina, violaceína e quinino.

## 2. Atividade *in vivo* anti-malária da violaceína

Como demonstrado a violaceína possui uma elevada capacidade em controlar o desenvolvimento parasitário *in vitro*, sendo assim avaliou-se se essa habilidade também era observada no modelo de infecção murina, no qual se leva em conta outros fatores como biodisponibilidade e farmacocinética.

Para isso, animais infectados por PcchAS foram tratados diariamente, por 11 dias consecutivos (dia 0-10 pós infecção), com diferentes doses de violaceína. Como se pode observar na Figura 13 e Tabela 2, os animais do grupo controle apresentaram um pico médio de parasitemia de 37.2% no dia 7 pós infecção. Semelhantemente ao controle, o grupo tratado com a menor dose (0.075 mg/kg) apresentou um elevado pico de parasitemia (38.0%) no dia 7 pós-infecção, não reduzindo a carga parasitária. Já o grupo tratado com 0.75 mg/kg apresentou um pico de parasitemia bem reduzido em relação ao controle, tendo inibido em 39.25% o desenvolvimento parasitário ( $P<0.01$ ). Os animais tratados com as maiores doses (3.75 mg/kg e 7.5 mg/kg) apresentaram uma inibição de  $82.12\% \pm 4.30$  ( $P<0.001$ ) e  $86.90\% \pm 3.53$  ( $P<0.001$ ) respectivamente. Esses valores de inibição sugerem a existência de um *plateau* na eficiência antimalária máxima da violaceína em 3.75 mg/kg. Entretanto, os animais tratados com a maior dose apresentaram uma inibição superior à dose imediatamente abaixo, especialmente nos dias que não o dia de pico de parasitemia (Tabela 2). Assim, apesar da existência do *plateau*, a maior dose foi capaz de conter mais eficientemente o desenvolvimento parasitário.

Posteriormente, uma vez demonstrada a eficácia da violaceína em inibir o desenvolvimento parasitário *in vivo*, avaliou-se se esse efeito anti-plasmodial poderia levar a uma diminuição na perda de eritrócitos nos camundongos, visto que normalmente em

infecções maláricas há uma acentuada perda de eritrócitos após o pico da parasitemia devido à destruição eritrocitária. Na Figura 14 nota-se que os animais do grupo controle tiveram uma acentuada queda no número de eritrócitos no dia 9 após infecção, reduzindo em 65% o número de células vermelhas em comparação ao dia anterior à infecção (dia 0). Já os animais tratados com as duas maiores doses (3.75 mg/kg e 7.5 mg/kg) apresentaram uma queda bem menos acentuada, não reduzindo mais que 15% o número de eritrócitos iniciais. Portanto a violaceína foi capaz de prevenir a destruição eritrocitária, sintoma clássico na infecção malárica.

Como durante a infecção por PcchAS normalmente se observa a presença de um segundo pico de parasitemia entre os dias 15-17 pós infecção, resultado da variação antigênica característica dessa espécie (Cox, 1988), acarretando na recrudescente parasitária. Como se pode observar na Figura 15, a violaceína inibiu a parasitemia em 85% ( $P < 0.001$ ) em relação ao controle no dia 7 (primeiro pico) e, mais, teve atividade também sobre o segundo pico (dia 16 pós-infecção), reduzindo a parasitemia em 58.98%,  $P < 0.05$ .

Como nosso tratamento anterior tem início no dia 0, antes que qualquer manifestação clínica da malária seja aparente, questionou-se se a violaceína teria eficácia se o tratamento se iniciasse após o estabelecimento da infecção e a presença de sintomas associados. Com esse intuito, animais infectados por PcchAS foram tratados por 6 dias consecutivos, tendo o tratamento iniciado no dia 5 pós-infecção, quando a parasitemia já atingia 15%, até o dia 10 pós infecção. Na Figura 16 observa-se que mesmo com o tratamento tendo se iniciado após uma infecção patente, a violaceína reduziu em 53.96% ( $P < 0.001$ ) o desenvolvimento parasitário no dia 7 pós-infecção (primeiro pico) quando comparado ao grupo não tratado.

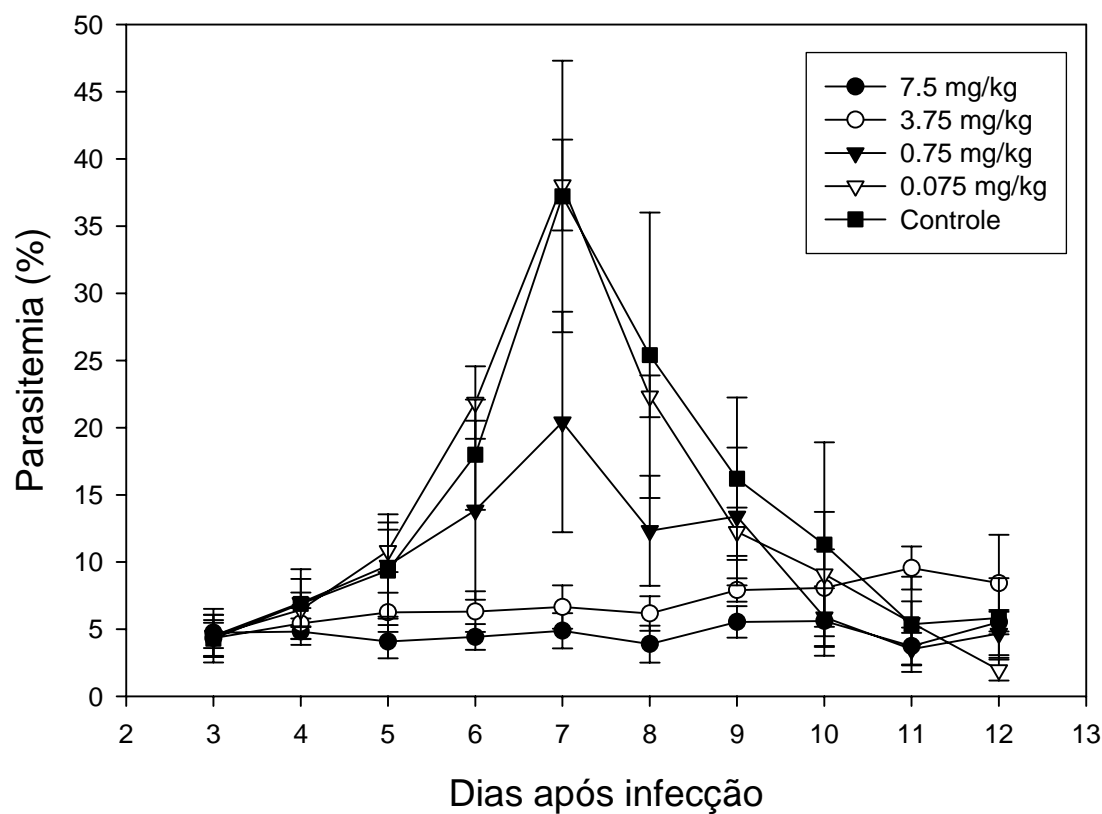
Outra questão abordada foi se a violaceína seria capaz de controlar a mortalidade de animais se utilizássemos uma cepa letal. Para isso, animais infetados, agora com PcchAJ, cepa murina letal, foram tratados ou não com 7.5 mg/kg de violaceína por 11 dias consecutivos (0-10 pós-infecção) e monitorados diariamente quanto a sobrevivência. Ao observar a Figura 17 nota-se que enquanto 100% dos animais não tratados sucumbiram à infecção, sendo que 60% morreram no dia 7 pós-infecção, nenhum animal tratado morreu até o dia 8 pós infecção, tendo um animal morrido no dia 9 e outro no dia 14 pós infecção. Esses dados revelam que a violaceína protegeu em 80% os animais da letalidade deste parasita ( $P < 0.0001$ ).

Para fins comparativos, efetuamos o mesmo tratamento feito para a violaceína, com a cloroquina e artesunato, drogas usualmente empregadas no tratamento contra a malária. Neste sentido, animais infectados com PcchAS foram tratados por 11 dias consecutivos em diferentes concentrações de artesunato e cloroquina, diariamente avaliou-se a parasitemia e os valores de  $ED_{50}$  para o dia 7 foram calculados para todas as drogas. Nota-se que a violaceína apresentou uma  $ED_{50}$  semelhante ao artesunato ( $P > 0.05$ ), no entanto se mostrou 2 vezes mais eficiente que a da cloroquina ( $P < 0.05$ ) no combate ao desenvolvimento parasitário no dia de pico da infecção (Tabela 3).

Por fim, como infecções maláricas tanto murina quanto humana apresentam uma disfunção hepática e também no baço, assim como um acúmulo de parasitas nesses órgãos (Dumont *et al.*, 1988), foi feita a análise histológica desses órgãos. Para isso, os órgãos de camundongos infectados com PcchAS e tratados com 7.5 mg/kg de violaceína, ou não, foram coletados no dia 7 pós infecção. Após a coleta dos órgãos, foi observado, a olho nu, o aumento expressivo de ambos os órgãos dos animais infectados e não tratados, assim



como uma alteração na coloração destes, com a presença de pontos escurecidos. Já os órgãos dos animais tratados apresentavam-se normal em tamanho e coloração. Os cortes histológicos de ambos os órgãos revelaram a presença abundante do pigmento malárico nos animais infectados e não tratados, enquanto nos animais tratados com a violaceína a presença desse pigmento foi bem reduzida (Figura 18).



**Figura 13. Atividade antimalárica *in vivo* de violaceína contra PcchAS.** Grupos de 8-10 camundongos C57BL/6 foram infectados i.p. com  $10^6$  EI de PcchAS, e tratados, ou não, com diferentes doses de violaceína administrada i.p. durante 11 dias consecutivos pós-infecção. A parasitemia foi determinada diariamente. Os resultados estão expressos como a média do grupo  $\pm$  desvio padrão.

**Tabela 2. Inibição da parasitemia, porcentagem em relação ao controle, de animais infectados por *P. chabaudi* AS sob tratamento com violaceína <sup>a</sup>.**

	Dia 5		Dia 6		Dia 7 <sup>b</sup>		Dia 8	
	Inibição (%) ± SD <sup>c</sup>	p <sup>d</sup>	Inibição (%) ± SD	p	Inibição (%) ± SD	p	Inibição (%) ± SD	p
Violaceína (mg/Kg)								
7.50	56,48 ± 12,84	<i>p</i> < 0,001	75,40 ± 5,17	<i>p</i> < 0,001	86,90 ± 3,53	<i>p</i> < 0,001	84,67 ± 5,43	<i>p</i> < 0,001
3.75	33,23 ± 14,72	<i>p</i> < 0,05	64,89 ± 8,00	<i>p</i> < 0,001	82,12 ± 4,33	<i>p</i> < 0,001	75,73 ± 13,93	<i>p</i> < 0,001
0.75	3,58 ± 33,80	NS <sup>e</sup>	20,42 ± 36,30	NS	39,25 ± 14,15	<i>p</i> < 0,01	48,85 ± 15,08	<i>p</i> < 0,01
0,075	NI <sup>f</sup>	ND	NI	ND	NI	ND	12,04 ± 6,11	NS <sup>g</sup>

<sup>a</sup> Os animais foram infectados, i.p., com 10<sup>6</sup> EI e depois tratados diariamente, ou não, com diferentes concentrações de violaceína durante 10 dias consecutivos a partir do dia 0.

<sup>b</sup> Pico da parasitemia.

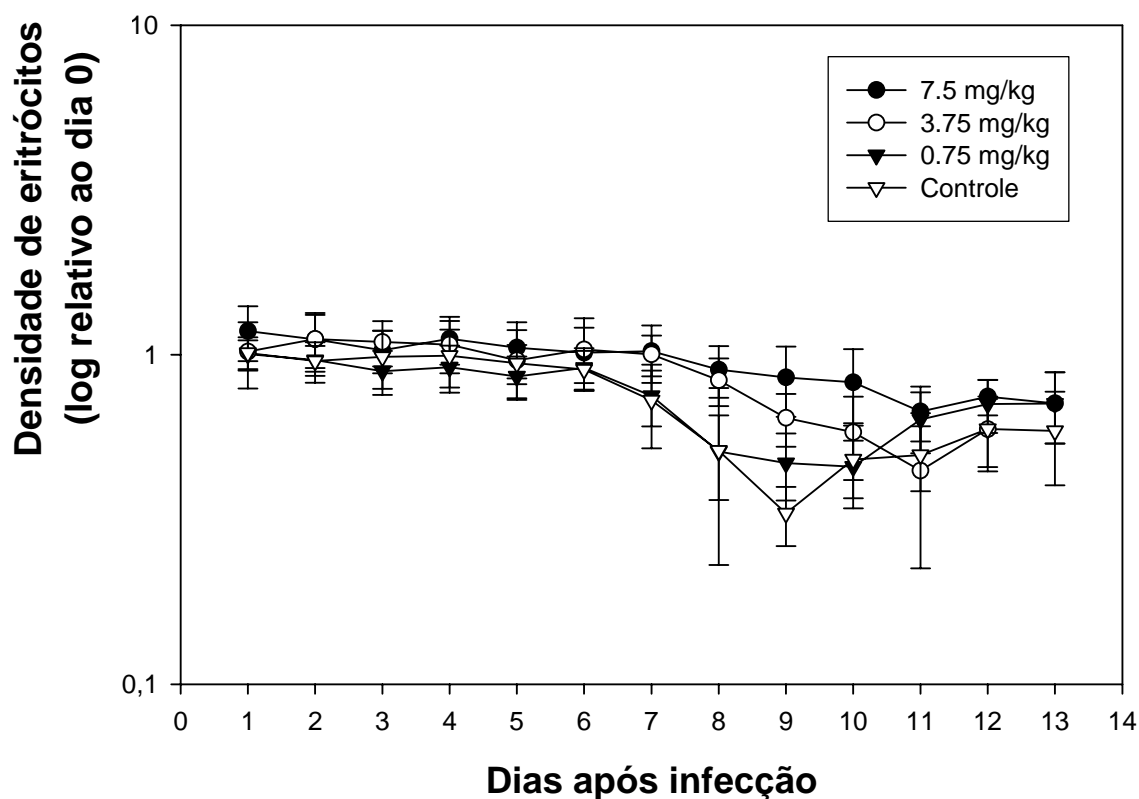
<sup>c</sup> Média e desvio padrão dos valores de inibição de um grupo de animais.

<sup>d</sup> Análise estatística, ANOVA 1 critério, entre animais tratados e não tratados.

<sup>e</sup> NS = Não significativo.

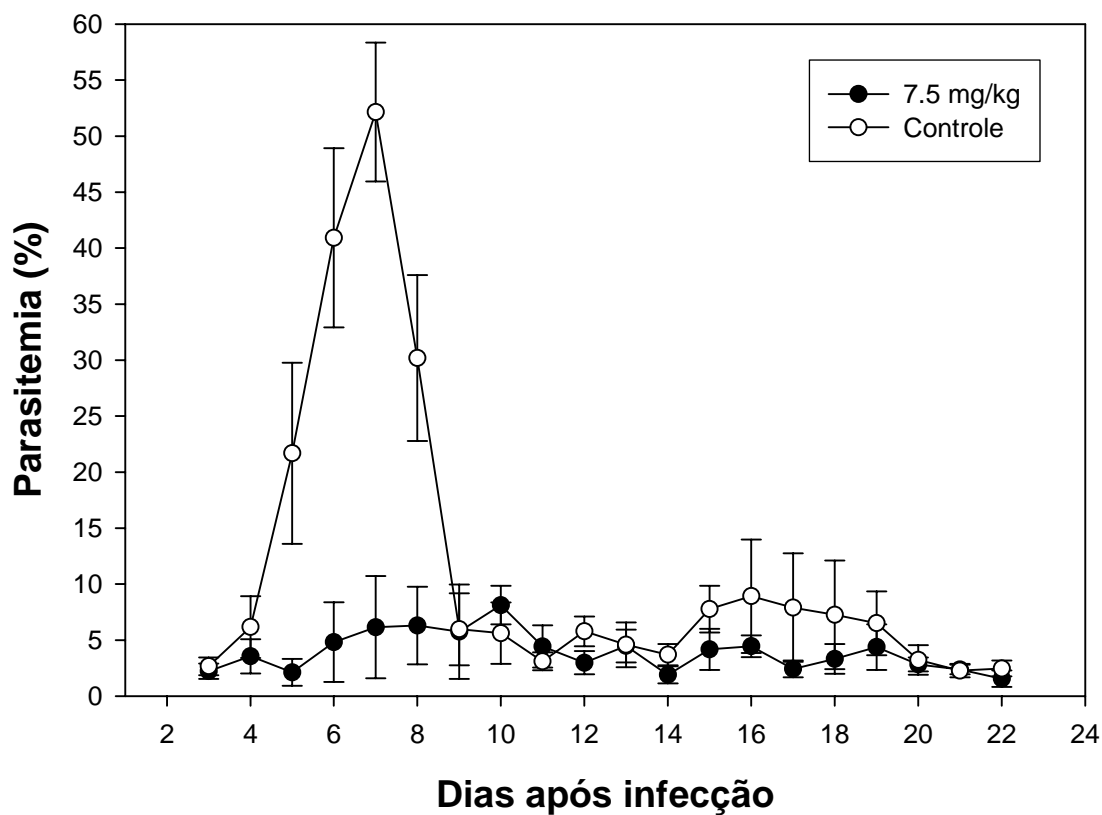
<sup>f</sup> NI = Não houve inibição.

<sup>g</sup> ND = Não determinado.



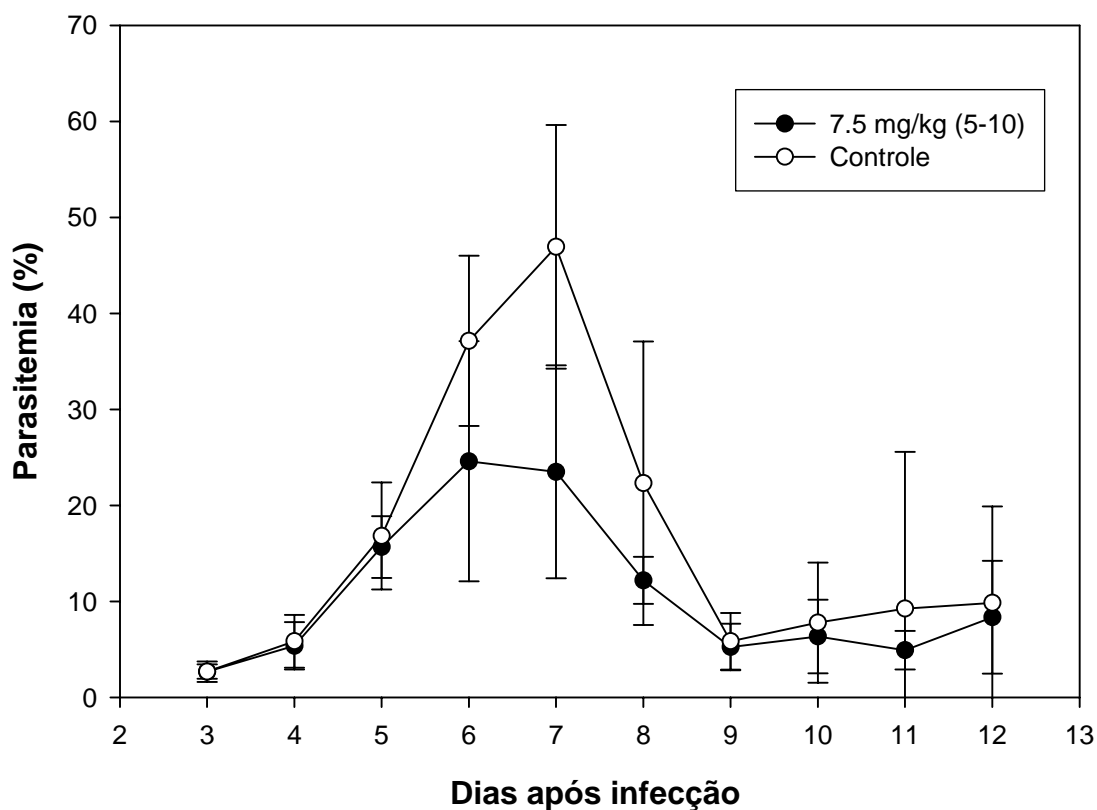
**Figura 14. Efeito da violaceína na perda de eritrócitos, anemia, sintoma associado à malária.**

Grupos de 8-10 camundongos C57BL/6 foram infectados i.p. com  $10^6$  EI de PcchAS, e tratado, ou não, com diferentes doses de violaceína administrada i.p. durante 11 dias consecutivos pós-infecção. A densidade de eritrócitos relativa foi determinada diariamente. Os resultados estão expressos como a média do grupo  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 15.**Atividade antimalárica *in vivo* de violaceína contra a recrudescência de PcchAS.

Grupos de 8-10 camundongos C57BL/6 foram infectados i.p. com  $10^6$  EI de PcchAS, e tratados, ou não, com 7.5 mg/kg de violaceína administrada i.p. durante 11 dias consecutivos pós-infecção. A parasitemia foi determinada diariamente até a cronificação da doença. Os resultados estão expressos como a média do grupo  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 16. Atividade *in vivo* da violaceína contra *P. c. chabaudi* AS, com o tratamento tendo início após o estabelecimento da infecção (dia 5).**

Grupos de 8-10 camundongos C57BL/6 foram infectados i.p. com  $10^6$  EI de PcchAS, e tratados, ou não, com diferentes doses de violaceína administrada i.p. durante 6 dias consecutivos (dia 5-10 pós-infecção). A parasitemia foi determinada diariamente. Os resultados estão expressos como a média do grupo  $\pm$  desvio padrão.

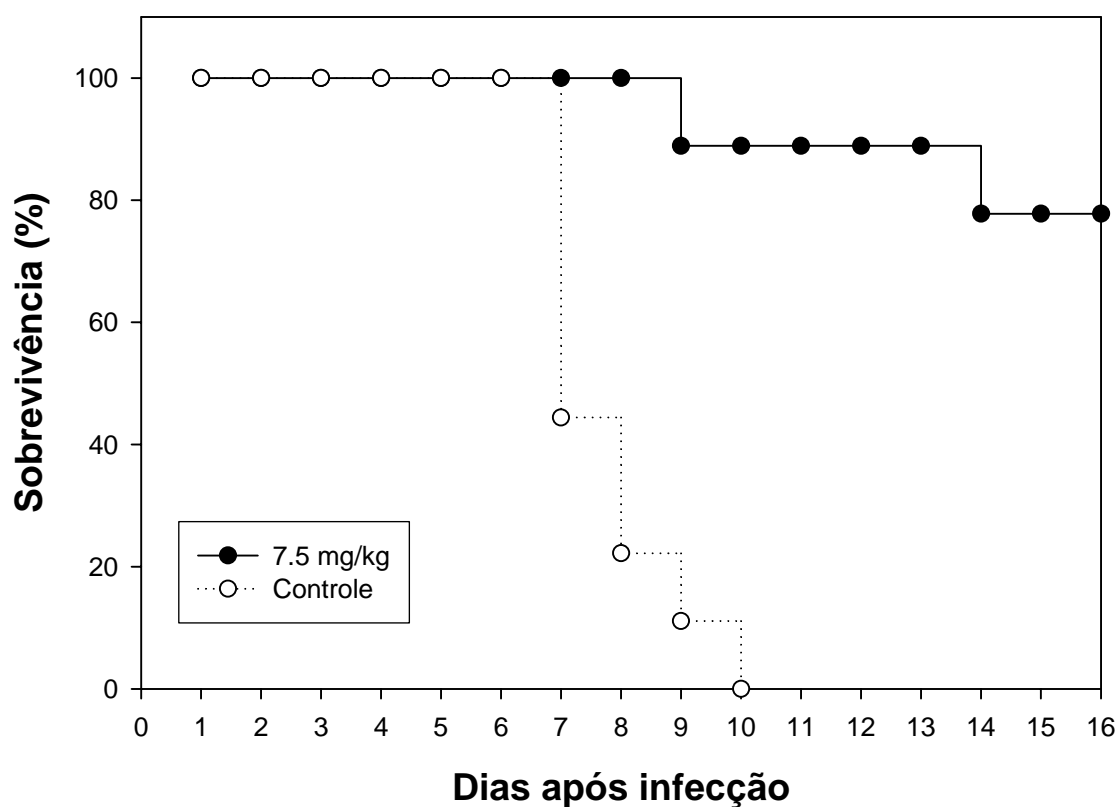
**Tabela 3. Comparação da atividade de diferentes antimaláricos em animais infectados com  $10^6$  EI *P. chabaudi* AS tratados com cloroquina, violaceína e artesunato.**

	ED 50 <sup>a</sup> (mg/kg) $\pm$ SD <sup>b</sup>	Significância <sup>c</sup>
Violaceína	0.94 $\pm$ 0.26	-----
Chloroquina	1.90 $\pm$ 0.76	$P < 0.05$
Artesunato	0.88 $\pm$ 0.22	NS

<sup>a</sup> ED 50, a dose necessária para reduzir a parasitemia em 50% em relação ao controle, foi avaliada com base em um gráfico do Log dose *versus* a atividade (expressa como porcentagem do controle) no dia do pico (dia 7).

<sup>b</sup> Média e desvio padrão dos valores de ED 50 de 3 experimentos independentes, utilizando diferentes estoques da droga.

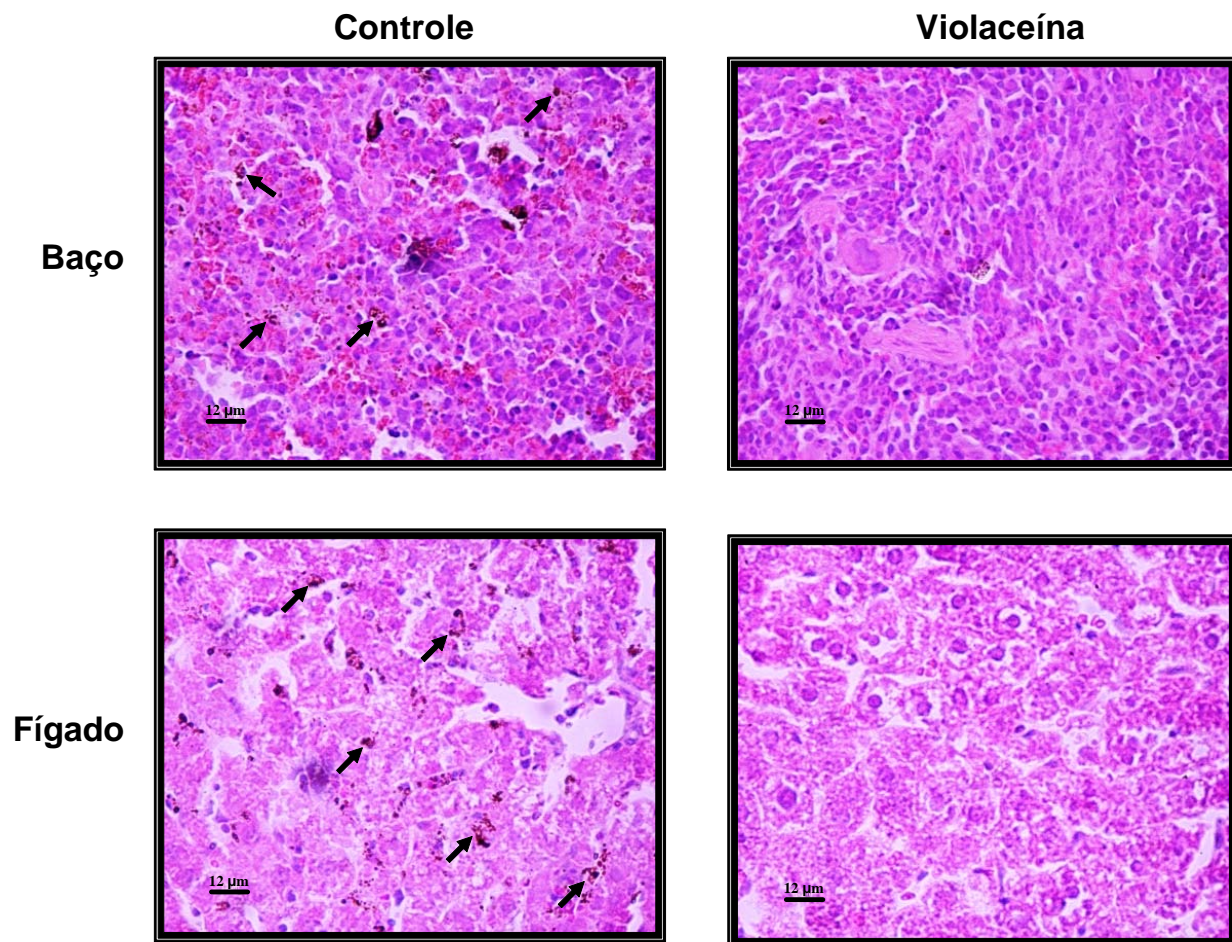
<sup>c</sup> Análise estatística, teste ANOVA 1 critério, entre os valores de ED 50 dos animais tratados com diferentes doses de cloroquina, violaceína e artesunato.



**Figura 17. Curva de sobrevivência de animais infectados com PcchAJ, uma cepa murina letal e tratados com a violaceína.**

Grupos de 8-10 camundongos C57BL/6 foram infectados i.p. com  $10^6$  EI de PcchAS, e tratados, ou não, com 7.5 mg/kg de violaceína administrada i.p. durante 11 dias consecutivos pós-infecção).

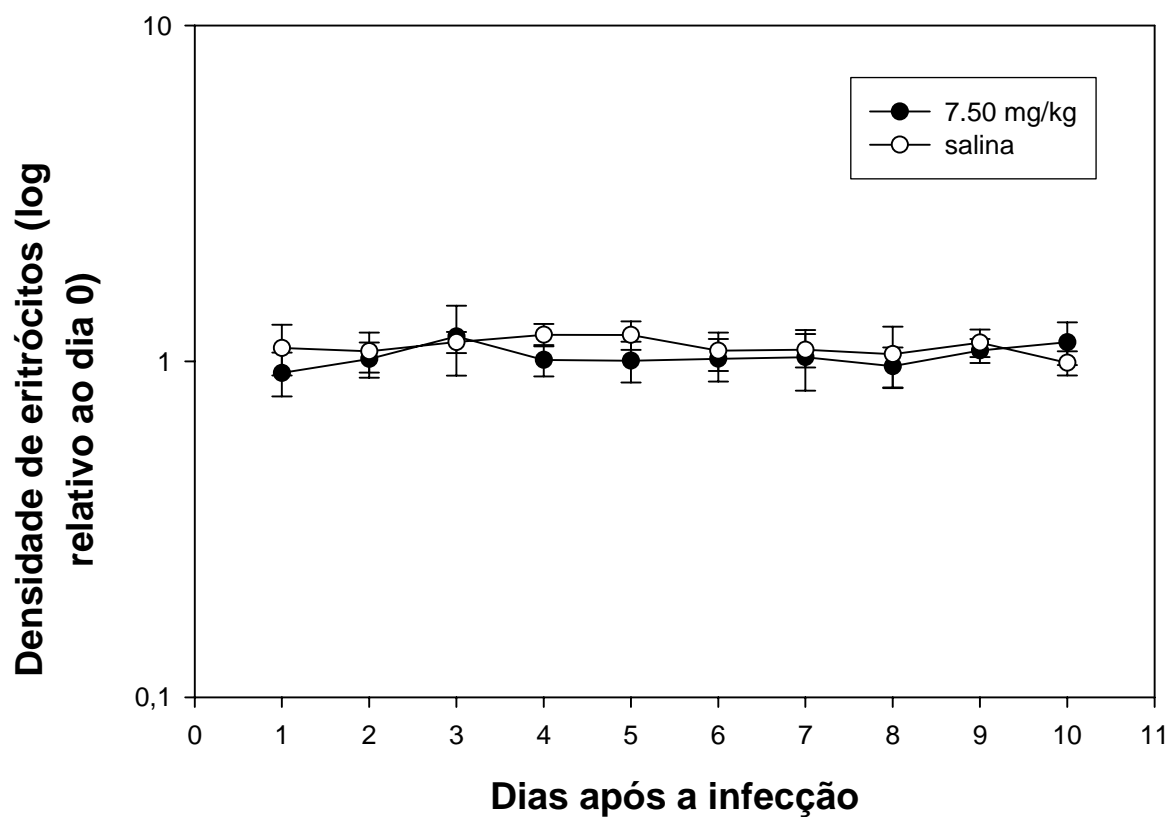


**Figura 18.**

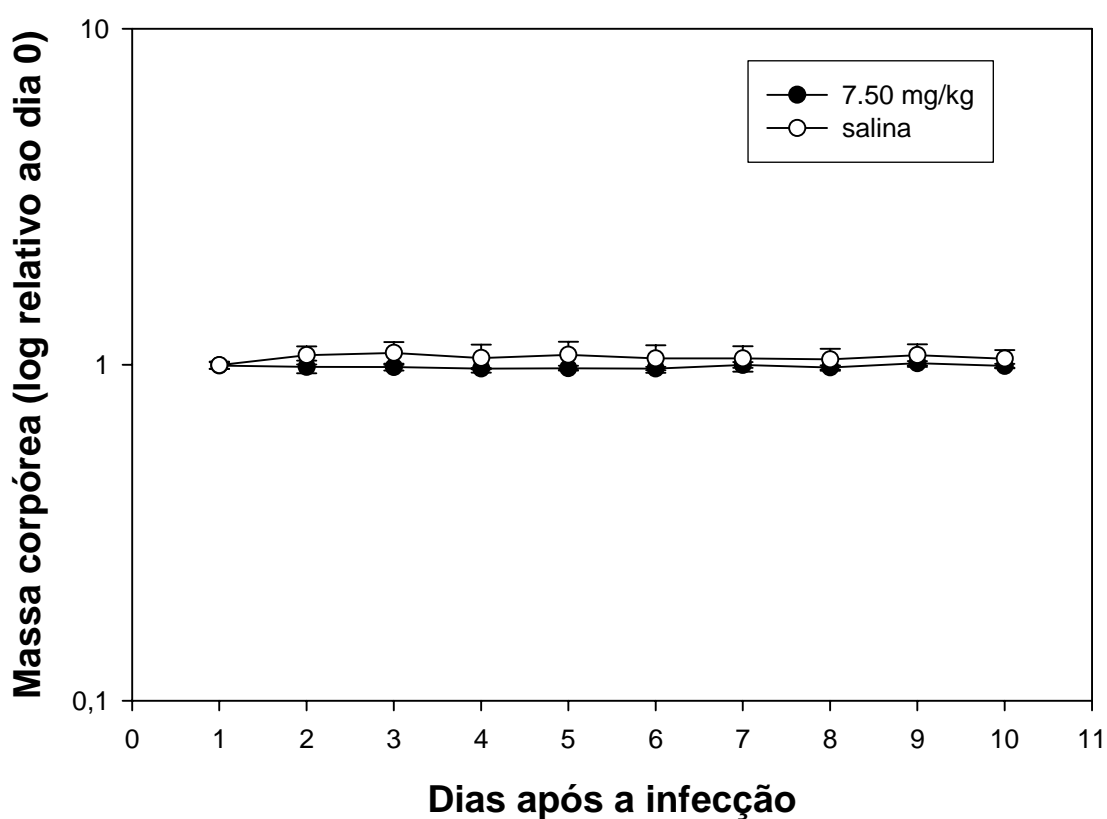
**Cortes histológicos de baço e fígado de animais infectados por PcchAS coletados no dia 7 pós a infecção.** Grupos de 6 camundongos C57BL/6 foram infectados i.p. com  $10^6$  EI de PcchAS, e tratados, ou não, a partir do dia 0 com 7.5 mg/kg de violaceína administrada i.p.. No dia 7 pós-infecção os animais foram sacrificados e os órgãos foram coletados, processados e os cortes foram corados com HE.

### **3. Toxicidade da violaceína em animais naïve**

A fim de avaliar os efeitos tóxicos da violaceína, inoculamos 7.5 mg/kg de violaceína em animais naïve por 11 dias consecutivos. Como controle, um grupo de animais foi inoculado com solução salina (NaCl 0.9%). Então, avaliou-se a densidade de eritrócitos e também o peso diariamente. Ao final do tratamento os animais foram sacrificados e os baços e fígados foram coletados, processados e feita a análise histológica. De acordo com a Figura 19 não houve variação na densidade de eritrócitos ao decorrer do tratamento, e também não houve perda significativa de peso em ambos os grupos. Além disso, como mostrado na Figura 21, nenhuma alteração morfológica aparente foi observada nos cortes histológicos do baço e fígado nos animais tratados com 7.5 mg/kg, sendo semelhante aos cortes do grupo controle.

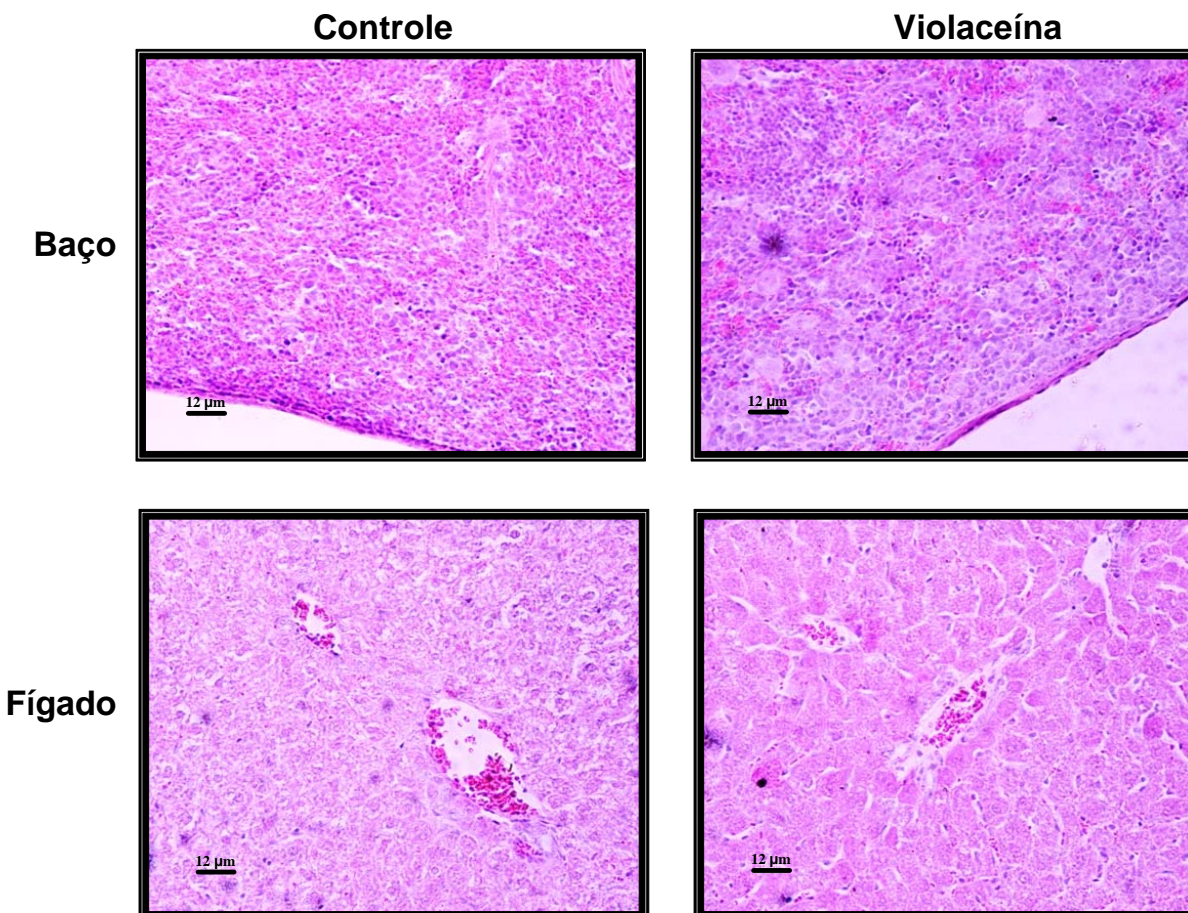


**Figura 19. Efeito tóxico da violaceína em relação à densidade de eritrócitos em animais naive.** Grupos de cinco camundongos C57BL/6 foram inoculados i.p. com a maior dose de violaceína ou salina durante 10 dias consecutivos. A densidade de eritrócitos relativa ao dia -1 da inoculação foi determinado diariamente. Os resultados estão expressos como a média do grupo  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 20. Efeito tóxico da violaceína em relação à massa corpórea em animais naive.**

Grupos de cinco camundongos C57BL/6 foram inoculados i.p. com a maior dose de violaceína ou salina durante 10 dias consecutivos. O peso relativo ao dia -1 da inoculação foi determinado diariamente. Os resultados estão expressos como a média do grupo  $\pm$  desvio padrão.



**Figura 21.** Cortes histológicos de baço e fígado de animais naive tratados ou não com violaceína.

Grupos de 6 camundongos C57BL/6 naive foram tratados, ou não, por 11 dias consecutivos com 7.5 mg/kg de violaceína administrada i.p.. Após o término do tratamento, os animais foram sacrificados e os órgãos foram coletados, processados e os cortes foram corados com HE.

## *Discussão*

A violaceína apresenta taxas de citotoxicidade bastante variáveis, dependendo da linhagem celular avaliada. Essas taxas variam de 30 nM até 12000 nM (Tabela 4) (Durán, 2007), o que sugere que a violaceína apresente mecanismos específicos a certos tipos celulares (De Carvalho *et al.*, 2006). Apesar da elevada toxicidade celular da violaceína descrita para algumas linhagens celulares (Tabela 4), a violaceína não mostrou ser extremamente tóxica aos eritrócitos sadios. Quando avaliada a citotoxicidade da violaceína em cultura primária de linfócitos humanos isolados do sangue periférico de adultos sadios, a droga apresentou uma  $IC_{50}$  maior que 10000 nM (Bromberg *et al.*, 2005), sendo esse valor abaixo do encontrado para os eritrócitos sadios, que mesmo na presença de 14000 nM, apresentou somente cerca de 30% de toxicidade. Evidências demonstram que a citotoxicidade da violaceína se deve a mecanismos apoptóticos e não de necrose celular (Duran *et al.*, 2007), assim como a apoptose é mediada por diversos mecanismos nucleares e os eritrócitos são anucleados, pode-se especular que seja esta a razão da toxicidade ser menos acentuada.

Quando avaliada a toxicidade da violaceína em formas sanguíneas de *P. falciparum* 3D7, a violaceína apresentou uma  $IC_{50}$  de 106.99 nM. Eliminando completamente o parasita em concentrações maiores que 500 nM, sendo tão eficiente quanto o quinino, a droga mais utilizada para o tratamento de malária e malária grave (van Agtmael *et al.* 1999), e três vezes menos eficiente que a cloroquina, cuja resistência já chega a índices maiores que 80% (WHO, 2001).

**Tabela 4. Citotoxicidade *in vitro* da violaceína em diversas linhagens celulares. Adaptada de Durán et al, 2007.**

Linhagem celular	IC50 (uM)	Referência
Linfócito humano	>10.0	Bromberg et al, 2005
HL60 (Leucemia mielóide)	0.8	Ferreira et al, 2004
MOLT-4 (Leucemia)	0.03	Melo et al, 2000
V79 (Fibroblastos de pulmão de hamster)	5.0-12.0	Melo et al, 2000
NCI-H460 (célula de pulmão)	0.03	Melo et al, 2000
KM-12 (câncer colón retal)	0.06	Melo et al, 2000
HT29 (câncer cólon retal)	>10.0	De Carvalho et al, 2006
Caco-2 (câncer cólon retal)	2.0	De Carvalho et al, 2006
HCT116 (câncer cólon retal)	1.5	De Carvalho et al, 2006
OCM-1 (melanoma)	3.69	Saraiva et al, 2004
RENCA (carcinoma renal murino)	0.6	Justo et al, 2005
EAT (tumor ascítico de Erlinch)	5.0	Justo et al, 2005

Sabe-se que a multi-resistência de alguns isolados de *P. falciparum* está associada a mutações em certos genes, como *pfmdr1* e *pfmdr2* (Foote *et al.*, 1989). Esses genes codificam proteínas homólogas a P-glicoproteína, proteína essa envolvida na resistência de células tumorais a algumas drogas (Gottesman *et al.*, 1996). Esses dados associados aos resultados notáveis da violaceína contra células tumorais (Tabela 4) (Duran *et al.*, 2007), nos permite especular que haja uma relação entre a atividade antitumoral e a atividade antimalárica da violaceína, reforçando futuros testes da atividade da violaceína contra isolados de *Plasmodium* multiresistentes.

Nos experimentos utilizando parasitas sincronizados, diferentemente dos derivados de artemisinina que agem diretamente sobre as formas jovens e da cloroquina com ação somente nas formas maduras (Benoit-Vical *et al.*, 2007), a atividade da violaceína foi



similar em ambos os estágios. Ou seja, a violaceína age no início do ciclo eritrocítico, contendo a infecção em um estágio inicial, assim como sob as formas maduras, responsáveis pela citoadesão de EI nas microvasculaturas, característica dos casos de malária grave (Costa *et al.*, 2006).

A maioria dos testes primários de drogas assim como seu modo de ação é feito em *P. falciparum* em cultura. Apesar disso, o estudo da ação de drogas em modelos murinos de *Plasmodium* é quase uma etapa obrigatória para estudos *in vivo* da atividade de novas moléculas (Landau & Gautret, 1998). Como a capacidade da violaceína em controlar o desenvolvimento parasitário *in vitro* já foi determinada, foi então avaliada se essa habilidade era mantida em um modelo de infecção murina, no qual outras características são levadas em consideração, como biodisponibilidade e farmacocinética.

A escolha de *P.c. chabaudi* AS se deu porque esse modelo apresenta diversas características biológicas do *P. falciparum*, como sua habilidade de invadir células vermelhas maduras, seu alto grau de sincronização das formas sanguíneas assexuadas e a seqüestração de eritrócitos infectados e os sintomas associados (Beauté-Lafitte *et al.*, 1994; Landau & Gautret, 1998; Mota *et al.*, 2000) sendo extremamente úteis na investigação de mecanismos imunopatológicos, na identificação de genes que regulam a susceptibilidade à malária e em estudos quimioterápicos (Stevenson & Riley, 2004).

A violaceína apresentou também uma importante atividade *in vivo*, com elevadas taxas de inibição (86%) da parasitemia em animais infectados por *P. c. chabaudi* (AS) e tratados por 11 dias consecutivos com a droga, em comparação aos animais não tratados. Além disso, houve diminuição significativa da destruição eritrocitária nos animais tratados com as maiores doses da violaceína, em comparação aos animais controle, que

apresentaram uma queda acentuada no número de eritrócitos nos dias subseqüentes ao pico de parasitemia (dia 7 pós-infecção). A perda eritrocitária é quase sempre observada no modelo murino, uma vez que usualmente a parasitemia é bem mais elevada que nos humanos, além disso, progride bem mais rápido nos animais (Landau & Gautret, 1998). Entretanto, apesar de ser a maior causa de mortes em regiões altamente endêmicas, a patogênese dessa destruição eritrocitária decorrente da malária é complexa, multifatorial e permanece pouco compreendida ([Pasvol](#), 1986; Philips & Pasvol, 1992, Martiney, 2000; Layez, 2005).

Além de inibir significativamente o primeiro pico parasitário, o tratamento com a violaceína por 11 dias consecutivos conseguiu conter a recrudescência parasitária, característica desta espécie de *Plasmodium*, que similarmente ao *P. falciparum* apresenta variação antigênica. Este composto mostrou-se eficiente também em inibir o desenvolvimento parasitário mesmo quando administrada após o estabelecimento da infecção (5 dias após a infecção), ou seja, mesmo com os índices parasitários altos (cerca de 15% de parasitemia) e as desordens fisiopatológicas associadas já presentes, a droga conseguiu conter a infecção e mostrar uma alta inibição parasitária (53.96%) em relação ao grupo não tratado. Além disso, a violaceína foi capaz de proteger 80% dos animais infectados com uma cepa murina letal *P. c. chabaudi* (AJ), em contraste a uma mortalidade de 100% nos animais não tratados, revelando um efeito protetor da violaceína mesmo em cepas mais patogênicas.

Outros sintomas freqüentes na malária aguda são a esplenomegalia e hepatomegalia, tanto em humanos quanto no modelo murino, sendo que em algumas infecções é possível observar o depósito do pigmento malárico em cortes histológicos de alguns órgãos (Landau

& Gautret, 1998). Neste sentido, foi observada a deposição desse pigmento no baço e fígado coletados do grupo não tratado. Em contraste a um depósito bem menos acentuado nos cortes histológicos dos animais do grupo tratado com a violaceína, demonstrando mais uma vez a redução parasitária e dos sintomas associados à malária.

Ao comparar os valores de  $ED_{50}$  de animais infectados com *P. c. chabaudi* (AS) tratados com outras drogas antimaláricas, a violaceína revelou ser significativamente mais eficiente que a cloroquina, uma vez que *P. c. chabaudi* (AS) é uma cepa sensível a cloroquina (Sohal & Arnot, 1993), e tão eficiente quanto o artesunato sódico. Os valores de  $ED_{50}$  encontrados para a cloroquina e artesunato corroboram com os valores presentes na literatura (Ancelin *et al.*, 2003; Benoit-Vical, 2007), demonstrando que as drogas utilizadas não apresentam atividade parcial.

A discrepância entre os valores do  $IC_{50}$  e  $ED_{50}$  encontrados para a cloroquina se deve, provavelmente, a seus efeitos imunossupressores descritos, como a interferência no processamento antigênico, inibição da produção de anticorpos, entre outros (Fong *et al.*, 2007; Engchanil *et al.*, 2006; Ertel *et al.*, 1991; Targett, 1992).

Apesar de haverem diversos estudos da toxicidade da violaceína *in vitro*, utilizando diferentes linhagens celulares, pouco se sabe dos efeitos tóxicos da violaceína *in vivo*. Particularmente, em um único estudo até então, animais foram inoculados com altas doses de violaceína (10 mg/kg; Duran *et al.*, 2003) e o único parâmetro avaliado foi a taxa de mortalidade dos animais. O presente trabalho além de demonstrar que a violaceína não alterou a massa corpórea e a densidade de glóbulos vermelhos, mostrou que este composto não induziu nenhuma alteração morfológica aparente no baço e fígado.

Esses resultados somados revelam a excelente atividade anti-plasmodial da violaceína contra as formas sanguíneas de *Plasmodium* sp, inibindo o desenvolvimento da infecção murina por PcchAS, reduzindo significativamente a sintomatologia associada; assim como, eliminando as formas sanguíneas de *P. falciparum* em concentrações extremamente baixas. E assim, abrem perspectivas para futuras análises dos mecanismos de ação e da capacidade deste composto na ação contra cepas quimioresistentes de *P. falciparum*.

*Conclusões*

- ✓ A violaceína apresentou reduzida toxicidade aos eritrócitos sadios.
- ✓ O efeito antimalárico da violaceína sob formas sanguíneas de *P. falciparum* 3D7 foi excelente, eliminando o parasita em baixas concentrações (menor que 1000 nM). Além disso mostrou-se tão eficiente quanto o quinino e três vezes menos eficiente que a cloroquina na inibição parasitária.
- ✓ A violaceína não é específica a um estágio de desenvolvimento de *P. falciparum* 3D7, tendo atividade similar em ambos os estágios (jovem e maduro).
- ✓ A violaceína inibiu significativamente o desenvolvimento da infecção por PcchAS em C57BL/6, reduzindo também os sintomas associados como a perda de eritrócitos e o acúmulo de pigmento malárico no fígado e baço.
- ✓ Em infecções por PcchAS a violaceína foi capaz de impedir a recrudescente parasitária, característica da infecção por esse *Plasmodium*.
- ✓ A ED50 da violaceína foi similar a do artesunato e duas vezes menor que a da cloroquina, no combate as formas sanguíneas de PcchAS no dia de pico da infecção (dia 7).
- ✓ A violaceína reduziu em 80% a taxa de mortalidade de animais infectados por PcchAJ.
- ✓ Não foi detectada a toxicidade da violaceína em C57BL/6 naive, no que se refere à perda de peso e de eritrócitos, assim como não foram percebidas alterações morfológicas em cortes histológicos de baço e fígado.

## *Referências Bibliográficas*

- AFONSO A., HUNT P., CHEESMAN S., ALVES A.C., CUNHA C.V., DO ROSÁRIO V., CRAVO P., 2006. Malaria parasites can develop stable resistance to artemisinin but lack mutations in candidate genes *atp6* (encoding the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase), *tctp*, *mdr1*, and *cg10*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:480-9.
- ALONSO P.L., SACARLAL,J., APONTE J.J., LEACH A., MACETE E., AIDE P., SIGAUQUE B., MILMAN J. , MANDOMANDO I., BASSAT Q., GUINOVART C., ESPASA M., CORACHAN S., LIEVENS M., NAVIA M.M., DUBOIS M., MENENDEZ C., DUBOVSKY F., COHEN J., THOMPSON R., BALLOU R., 2005. Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomized controlled trial. *The Lancet* 366: 2012–8.
- AMINO R., THIBERGE S., MARTIN B., CELLI S., SHORTE S., FRISCHKNECHT F., MÉNARD R., 2006a. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nature* 12: 220-4.
- ANCELIN M.L., CALAS M., BONHOURE A., HERBUTE S., VIAL H.J., 2003. In vivo antimalarial activities of mono- and bis quaternary ammonium salts interfering with *Plasmodium* phospholipid metabolism. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2598-605.



- ANDRIGHETTI-FRÖHNER C.R., ANTONIO R.V., CRECZYNSKI-PASA T.B.,  
BARARDI C.R.M., SIMÕES C.M.O., 2003. Cytotoxicity and potential antiviral  
evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Mem Ins  
Oswaldo Cruz* 98, 843-8.
- BAIRD J.K., 2004. Chloroquine resistance in *Plasmodium vivax*. *Antimicrob Agents  
Chemother* 48, 4075-83.
- BAIRD J.K., 2007. Neglect of *Plasmodium vivax*. *Trends Parasitol.* 23,533-9.
- BALLANTINE J.A., BEER R.J.S., CRUTCHEY D.J., DODD G.M., PALMER D.R., 1960.  
The chemistry of bacteria. Part VIII. The synthesis of violacein and related  
compounds. *J Chem Soc* 459, 2292-9.
- BEAUTE-LAFITTE A., ALTEMAYER-CAILLARD V., GONNET-GONZALEZ F.,  
RAMIARAMANANA L., CHABAUD A.G., LANDAU I., 1994. The chemosensitivity  
of the rodent malaras -relationships with the biology of merozoites. *Int J Parasitol*  
24, 981-6.
- BENOIT-VICAL F., LELIÈVRE J., BERRY A., DEYMIER C., DECHY-CABARET O.,  
CAZELLES J., LOUP C., ROBERT A., MAGNAVAL J.F., MEUNIER B., 2007.  
Trioxyaquines are new antimalarial agents active on all erythrocytic forms, including  
Gametocytes. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1463-72.
- BLOLAND P.B., ETTLING M., SEEK M., 2000. Combination therapy for malaria in  
Africa: hype and hope. *Bull. World Health Org* 78, 1378-88.
- BROMBERG N. & DURÁN N., 2001. Violacein biotransformation by basidiomycetes and  
bacteria. *Lett Appl Microbiol* 33, 316-9.

- BROMBERG, N. “Biotransformação da Violaceína”, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas–SP – Brasil, 2000.
- CARLTON J.M., HAYTON K., CRAVO P.V., WALLIKER D., 2001. Of mice and malaria mutants: unravelling the genetics of drug resistance using rodent malaria models. *Trends Parasitol* 17, 236-42.
- CARNEY C.K., SCHRIMPE A.C., HALFPENNY K., HARRY R.S., MILLER C.M., BRONCEL M., SEWELL S.L., SCHAFF J.E., DEOL R., CARTER M.D., WRIGHT D.W., 2006. The basis of the immunomodulatory activity of malaria pigment (hemozoin). *J Biol Inorg Chem* 11, 917–29.
- CARRAZ M., JOSSANG A., FRANETICH J.F., SIAU A., CICERON L., HANNOUN L., SAUERWEIN R., FRAPPIER F., RASOANAIVO P., SNOUNOU G., MAZIER D., 2006. A plant-derived morphinan as a novel lead compound active against malaria liver stages. *PLoS Med* 3, e513.
- COSTA F.T.M., NOGUEIRA P.A., GYSIN J., 2006. Cytoadhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes and the infected placenta: a two-way pathway. *Braz J Med Biol Res* 39, 1525-36.
- COX F.E.G. ,1988. Animal Models. pg: 1053-543. In W.H. Wernsdorfer e McGregor I. In: Malaria Principles and practice malariology. Churchill Livingstone, London.
- CRAVO P., CULLETON R., HUNT P., WALLIKER D., MACKINNON M.J., 2001. Antimalarial drugs clear resistant parasites from partially immune hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2897-901.

- DE CARVALHO D.D., COSTA. F.T.M., DURAN N., HAUN M., 2006. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicol In Vitro* 20, 1514-21.
- DE SOUZA A.O., AILY D.C.G., SATO D.N. & DURÁN N., 1999. Atividade da violaceína *in vitro* sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37RA. *Rev Inst Adolfo Lutz* 58, 59-62.
- DONDORP A. M., NEWTON P. N., MAYXAY M, VAN DAMME W., SMITHUIS F. M., YEUNG S., PETIT A., LYNAM A. J., JOHNSON A., HIEN T. T, MCGREADY R., FARRAR J. J., LOOAREESUWAN S., DAY N. P., GREEN M. D., WHITE N. J., 2004. Fake antimalarials in Southeast Asia are a major impediment to malaria control: multinational cross-sectional survey on the prevalence of fake antimalarials. *Trop Med Int Health* 9,1241-6.
- DUFFY P.E. & FRIED M., 2005. Malaria in the pregnant woman. *Curr Top Microbiol Immunol* 295, 169-200.
- DUMONT M.E, DEI-CAS E., MAUROIS P., SLOMIANNY C., PRENSIER G., HOUCHE-LECOMTE M., VERNES A., CAMUS D., 1988. *Ann Parasitol Hum Comp* 63, 171-83.
- DURÁN N. & HAUN M., 1997. Production process of preparation and purification of antitumoral (3-(1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ylidene)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one). Brazilian Patent PIBr. 9702918.
- DURÁN N., CAMPOS V., ERAZO S., 1983. Bacterial Chemistry-II: Antimicrobial Photoproduct from Pigment of *Chromobacterium violaceum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 55, 231.

- DURAN N., CAMPOS V., RIVEROS R., JOYAS A., PEREIRA MF., HAUN M., 1989. Bacterial chemistry-III: preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products. *An Acad Bras Cienc* 61, 31-6.
- DURÁN N., HAUN M., PEREIRA DA SILVA L., PISANI R., PISANI F.J.C., SOUZA-BRITO A.R.M., MAZETTO M.N., NUNES O.D.S., 1990. Comparison of the antiviral activity and toxicity of a protein magnesium ammonium phospholipole anhydride polymer with other antiviral drugs. *Braz J Med Biol Res* 23, 1303-13.
- DURAN N., JUSTO G.Z, FERREIRA C.V., MELO P.S., CORDI L., MARTINS D., 2007. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnol Appl Biochem* 48, 127-33.
- DURAN N., MENCK C.F., 2001. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. *Crit Rev Microbiol* 27, 201-22.
- DURAN, N., JUSTO, G.Z., MELO, P.S., DE AZEVEDO M.B., BRITO A.R., ALMEIDA A.B., HAUN M., 2003. Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with beta-cyclodextrin. *Can J Physiol Pharmacol* 81, 387-96.
- ENGWERDA C, BELNOUE E, GRUNER AC, RENIA L., 2005. Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol*. 297, 103-43

- ERTEL W., MORRISON M.H., AYALA A., CHAUDRY I.H., 1991. Chloroquine attenuates hemorrhagic shock-induced suppression of Kupffer cell antigen presentation and major histocompatibility complex class II antigen expression through blockade of tumor necrosis factor and prostaglandin release. *Blood* 78, 1781-8.
- FERNANDEZ V., 2004. Sorbitol-synchronization of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. In LJUNGSTRÖM I *et al.* In Methods in Malaria Research.
- FERREIRA C.V., BOS C.L., VERSTEEG H.H., JUSTO G.Z., DURAN N., PEPPELENBOSCH M.P., 2004. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood* 104, 1459-64.
- FONG T., TRINKAUS K., ADKINS D., VIJ R., DEVINE S.M., TOMASSON M., GOODNOUGH L.T., LOPEZ S., GRAUBERT T., SHENOY S., DIPERSIO J.F., KHOURY H.J., 2007. A randomized double-blind trial of hydroxychloroquine for the prevention of chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 13, 1201-6.
- FOOTE S.J., THOMPSON J.K., COWMAN A.F., KEMP D.J., 1989. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell* 57, 921-30.
- GAUTRET P, COQUELIN F, MORA-SILVERA E, CHABAUD AG, LANDAU I., 1998. Chronosexuality of *Plasmodium* species of Central African Muridae. *Parassitologia* 40, 255-8.

- GILKS C.F., WALLIKER D. & NEWBOLD C.I. (1990). Relationships between sequestration, antigenic variations and chronic parasitism in *Plasmodium chabaudi chabaudi* – a rodent malaria model. *Parasite Immunology* 12, 45-64.
- GOTTESMAN M.M., PASTAN I., AMBUDKAR S.V., 1996. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* 6, 610-7.
- HAUN M., PEREIRA M.F., HOFFMAN M.E., JOYAS A., CAMPOS V., FILARDI L.D.S., DE CASTRO S.L., DURÁN N., 1992. Bacterial chemistry. VI. Biological activities and cytotoxicity of 1,3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives. *Biol Res* 25, 21-5.
- HAY SI, GUERRA CA, TATEM AJ, NOOR AM, SNOW RW., 2004. The global distribution and population at risk of malaria: past, present and future. *Lancet Infect Dis* 4, 327-36.
- HOFFMAN, S. L., 2006. Malaria: A protective paradox. *Nature* 444, 824-7
- HOLDING P.A., STEVENSON J. PESHU N., MARSH K., 1999. Cognitive sequelae of severe malaria with impaired consciousness. *Soc Trop Med Hyg* 93, 529-34.
- ITTARAT W., PICKARD A. L., RATTANASINGANCHAN P., WILAIRATANA P., LOOAREESUWAN S., EMERY K., LOW J., UDOMSANGPETCH R., MESHNICK S. R., 2003. Recrudescence in artesunate-treated patients with falciparum malaria is dependent on parasite burden not on parasite factors. *Am J Trop Med Hyg* 68, 147–52.

- JAMBOU R., LEGRAND E., NIANG M., KHIM N., LIM P., VOLNEY B., EKALA M.T., BOUCHIER C., ESTERRE P., FANDEUR T., MERCEREAU-PUIJALON O., 2005. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 366, 1960-3.
- JUSTO G.Z., FERREIRA C.V., PEPPELENBOSCH M.P., DURAN N., 2005. Cellular and molecular targets in the evaluation of the antitumor potential of biocompounds *Annual Rev Biomed Sci* 7, 1.
- KODACH L.L., BOS C.L., DURAN N., PEPPELENBOSCH M.P., FERREIRA C.V., HARDWICK J.C., 2006. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 27, 508-16.
- KWIATKOWSKI D. & MARSH K., 1997. Development of a malaria vaccine. *The Lancet* 350, 1696-701.
- LANDAU I. & GAUTRET P., 1998. Animal models: Rodents. In I.W. Sherman. In: *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*. ASM Press, Washington D.C.
- LAYEZ C., NOGUEIRA P., COMBES V., COSTA F.T.M., JUHAN-VAGUE I., SILVA L.H.P., GYSIN J. 2005. *Plasmodium falciparum* rhoptry protein RSP2 triggers destruction of the erythroid lineage. *Blood* 106, 3632-8.
- LE BRAS, J. & DURAND, R., 2003. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* 17, 147-53.

- LEON L.L., MIRANDA C.C., DE SOUZA A.O., DURAN N., 2001. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J Antimicrob Chemother* 48, 449-50.
- LICHSTEIN H.C., VAN DE SAND V.F., 1946. The Antibiotic Activity of Violacein, Prodigiosin, and Phthiocol. *J Bacteriol* 52,145-6.
- LOMAR A.V., VIDAL J.E., LOMAR F.P., BARBAS C.V., MATOS G.J., BOULOS M., 2005. Acute respiratory distress syndrome due to vivax malaria: case report and literature review *Braz J Infect Dis* 9, 425-30.
- MAKKAR R.P., MUKHOPADHYAY S., MONGA A., GUPTA A.K. 2002. *Plasmodium vivax* malaria presenting with severe thrombocytopenia. *Braz J Infect Dis* 6, 263-5.
- MARTINEY J.A., SHERRY B., METZ C.N., ESPINOZA M., FERRER A.S., CALANDRA T., BROXMEYER H.E., BUCALA R., 2000. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after Ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infection and Immunity* 68, 2259–67.
- MAY G., BRUMMER B., OTT H., 1991. Ger. Offen. DE 3935066.
- MCGREADY R., DAVISON B.B., STEPNIEWSKA K., CHO T., SHEE H., BROCKMAN A., UDOMSANGPETCH R., LOOAREESUWAN S., WHITE N.J., MESHNICK S.R., NOSTEN F., 2004. The effects of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections on placental histopathology in an area of low malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 70, 398-407.



- MELO P.S., JUSTO G.Z., DE AZEVEDO M.B., DURAN N., HAUN M., 2003. Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. *Toxicology* 186, 217-25.
- MELO P.S., MARIA S.S., VIDAL B.C., HAUN M., DURAN N. 2000. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36, 539-43.
- MENDIS K, SINA BJ, MARCHESINI P, CARTER R., 2001. The neglected burden of *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* 64, 97-106.
- MOTA M.M., JARRA W., HIRST E., PATNAIK P.K., HOLDER A.A., 2000. Plasmodium chabaudi-infected erythrocytes adhere to CD36 and bind to microvascular endothelial cells in an organ-specific way. *Infect Immun* 68, 4135-44.
- MUTABINGWA T. K., 2005. Artemisinin-based combination therapies (ACTs): best hope for malaria treatment but inaccessible to the needy! *Acta Trop* 95, 305–15.
- NATURE OUTLOOK, 2004. Malaria. *Nature* 430, 923-45.
- NOSTEN F., MCGREADY R., SIMPSON J.A., THWAI K.L., BALKAN S., CHO T., HKIRIJARON L., LOOAREESUWAN S., WHITE N.J., 1999. Effects of *Plasmodium vivax* malaria in pregnancy. *Lancet* 354, 546-9.
- OGUTU B.R., SMOAK B.L., NDUATI R.W., MBORI-NGACHA D.A., MWATHE F., SHANKS G.D., 2000. The efficacy of pyrimethamine-sulfadoxine (Fansidar) in the treatment of uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in Kenyan children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 83-4.
- OLLIARO P., 2005. Drug resistance hampers our capacity to roll back malaria. *Clin Infect Dis* 41, S247–S257.

- ONYIORAH E., VAN HENSBROEK M.B., JAH M.S., GREENWOOD B., 1996. Early clinical failures after pyrimethamine-sulfadoxine treatment of uncomplicated falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90, 307-8.
- OZEN M., GUNGOR S., ATAMBAY M., DALDAL N., 2006. Cerebral malaria owing to *Plasmodium vivax*: case report. *Ann Trop Paediatr* 26, 141-4.
- PASVOL G., 1986. The anaemia of malaria. *QJM Monthly J Assoc Phys* 58, 217-9.
- PHILLIPS R. E. & PASVOL G., 1992. Anaemia of plasmodium falciparum malaria. *Baillieres Clin Haematol* 5, 315-30.
- RATHOD P.K., MCERLEAN T. & LEE P.C., 1997. Variations in frequencies of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 9389-93.
- RETTORI, D. & DURÁN, N., 1998. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J Microbiol Biotechnol* 14, 685-8.
- SARAIVA V.S., MARSHALL J.C., COOLS-LARTIGUE J., BURNIE-JR M.N., 2004. Cytotoxic effects of violacein in human uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res* 14, 421-4.
- SCHLICHTHERLE S., GANDJOUR A., NEUGEBAUER A., RÜSSMANN W., LAUTERBACH K.W., 2000. The cost-effectiveness of screening strategies for amblyopia: a preliminary report. *Strabismus* 8, 291-5.

- SHIRATA A., TSUKAMOTO T., YASUI H., HATA T., HAYASAKA S., KOJIMA A. & KATO H., 2000. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. *Japan Agric Res Quart* 34, 131-40.
- SLATER A. F. & CERAMI A., 1992. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* 355, 167-9.
- SOARES, I.S. & RODRIGUES, M.M., 1998. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. Malaria vaccine. *Braz J Med Biol Res* 31, 317-32
- SOHAL, A.K. & ARNOT, D.E., 1993. Plasmodium chabaudi: a short-term in vitro culture method and its application to chloroquine resistance testing. *Exp Parasitol* 76, 314-7.
- STEVENSON M.M. & RILEY E.M., 2004. Innate Immunity to Malaria. *Nature Reviews* 4, 169-180.
- TARGETT G.A.T., 1992. Malaria: drug use and the immune response. *Parasitology* 105, S61-S70.
- THIBERGE S., BLAZQUEZ S., BALDACCI P., RENAUD O., SHORTE S., MÉNARD R., AMINO R., 2007. In vivo imaging of malaria parasites in the murine liver. *Nat Protoc* 2, 1811-8.
- TRAGER, W. & JENSEN, J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673-5.
- TRAMPUZ A., JEREB M., MUZLOVIC I., PRABHU R.M., 2003. Clinical review: severe malaria. *Critical Care* 7, 315-323.

- TRIGG J.K., MBWANA H., CHAMBO O., HILLS E., WATKINS W., CURTIS C.F., 1997. Resistance to pyrimethamine/sulfadoxine in *Plasmodium falciparum* in 12 villages in north east Tanzania and a test of chlorproguanil/dapsone. *Acta Trop* 63, 185-9.
- TRIGG P.I. & KONDRACHINE A.V. 1998. Commentary: malaria control in the 1990s. *Bull World Health Organ.* 76, 11-16
- VAN AGTMAEL M.A., EGGELE T.A., VAN BOXTEL C.J., 1999. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medicine. *Trends Pharmacol Sci* 20, 199–205.
- WERNSDORFER W.H. & PAYNE D., 1991. The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* 50, 95-125.
- WHITE N.J., 2004. Antimalarial drug resistance. *J Clin Invest* 113, 1084-92.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1997). WHO Wkly Epidem Rec 22, 161.
- WHO, 2001. Antimalarial drug combination therapy: report of a WHO technical consultation. Report WHO/CDS/RBM/2001.35. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WINTER G., CHEN Q., WAHLGREN M., 2000. Meetingreport: the molecular background of severe and complicated malaria. *Mol Biochem.* 407, 1018-22.

## *Anexo 1*

Artigo Versão Preliminar

## IN VITRO AND IN VIVO ANTIMALARIAL ACTIVITY OF VIOLACEIN EXTRACTED FROM *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*

**Running title:** Anti-malarial activity of violacein

Stefanie C. P. Lopes <sup>a,b</sup>, Yara C. Blanco <sup>a,b</sup>, Giselle Z. Justo <sup>c</sup>, Paulo A. Nogueira <sup>d,#</sup>,  
Francisco L. S. Rodrigues <sup>c</sup>, Uta Goelnitz <sup>e</sup>, Gerhard Wunderlich <sup>e</sup>, Gustavo Facchini <sup>f</sup>,  
Marcelo Brocchi <sup>a</sup>, Nelson Duran <sup>c,g</sup> and Fabio T. M. Costa <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology & Immunology, Institute of Biology, IB. State University of  
Campinas – UNICAMP. P.O. Box 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Parasitology, IB, UNICAMP.

<sup>c</sup> Institute of Chemistry, UNICAMP, C.P. 6154, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

<sup>d</sup> IPEPATRO/CEPEM - BR 364 KM 4.5, 78900-970, Porto Velho, RO, Brazil.

<sup>e</sup> Department of Parasitology – ICB-2. University of São Paulo – USP, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Physiology and Biophysics, IB, UNICAMP.

<sup>g</sup> Center of Environmental Sciences, University of Mogi das Cruzes, 08701-970, Mogi das Cruzes,  
SP, Brazil

\* Corresponding author: Fabio T. M. Costa, Department of Microbiology & Immunology, Institute  
of Biology, IB; State University of Campinas - UNICAMP. Campinas, SP.

P.O. Box 6109. 13083- 862, Brazil. Phone: + 55 19 3788-6271, Fax: + 55 19 3788-6276

E-mail address: [costaftm@unicamp.br](mailto:costaftm@unicamp.br)

# Present address: Fiocruz - Leonidas & Maria Deane Researcher Center; Laboratory of Biodiversity in healthy. 69057-070 - Manaus, AM – Brazil.

Key words: Malaria, Anti-malarial activity, Violacein, *Chromobacterium violaceum*.

## ABSTRACT

Violacein is a violet pigment extracted from the bacteria Gram-negative *Chromobacterium violaceum*. Growing bodies of evidences have implicated violacein as an antimicrobial, antifungal, antitumoral, and a moderate trypanocidal and leishmanial activity has also been observed. Herein, we evaluated the anti-malarial activity of violacein against murine and human-derived *Plasmodium*. Indeed, violacein showed to be efficient in killing *P. falciparum* (3D7 strain) as much as quinine, but 3 fold less pronounced than chloroquine. Moreover, this anti-*Plasmodial* activity detected was direct against both young and mature stages of this human parasite. In vivo experiments in *P. c. chabaudi* AS (PcchAS) infected mice treated during 11 consecutive days after infection (0-10) revealed a powerful activity of this drug, by inhibiting parasite burden up to 86%. Also, 60% of inhibition was noticed when violacein was administrated 5 days after infection establishment. When administrated in mice infected with a lethal strain of murine-derived *Plasmodium* (PcchAJ) violacein protected 80% of these mice, in contrast to 100% of mortality reported to the non-treated animals. ED<sub>50</sub> comparisons demonstrated that violacein was efficient as much as artesunate and twice more active than chloroquine. Finally, naïve mice inject with violacein during 11 consecutive days did not display alterations on red blood cell density; corporal mass and neither morphological damages were noticed in spleen and liver histological sections. Collectively, these data clearly

demonstrated the anti-malarial effect of violacein and open perspectives to understating the mechanisms involved in killing this parasite by this compound.



## INTRODUCTION

Malaria, one of the oldest infectious diseases on the planet, still casts a formidable shadow on many parts of the world, causing hundreds of millions of new infections and millions of deaths each year (Nahlen *et al.*, 2003). Malaria parasites infect 300–500 million people and kill about 2 million individuals annually. It is estimated that over 3 billion people live under the threat of malaria.

One of the major reasons for the morbidity and mortality is the widespread emergence of drug-resistant strains of the parasite. Particularly, the efficacy of clinically available antimalarials, such as chloroquine, primaquine, and pyrimethamine, is dramatically decreasing (Le Bras and Durand, 2003). As the results of trials with malaria vaccines have been disappointing, malaria control still depends on the use of effective antimalarial drugs. However, vaccine research is still proceeding and vaccination remains the most cost-effective strategy to solve the malaria problem (Targett, 2005). Therefore, new antimalarial drugs representing a new class of molecular framework and displaying novel mechanism of action compared to clinically used drugs are urgently needed.

Whereas quinine has been the most widely used drug for severe malaria (WHO, 2000), artemisinin and its derivatives have been considered as alternative to quinine because they have been shown to be effective against multiple-drug-resistant malaria parasites; no clinical resistance towards them has been documented. Moreover, they produce faster relief of symptoms and clearance of parasites than any other antimalarial drug (van Agtmael *et al.*, 1999, Woodrow *et al.*, 2005). These compounds are the most recent efficient antimalarial drugs approved for human use as single therapy or in combination (O'Neill, 2005).

Violacein, a violet-pigment isolated from *Chromobacterium violaceum* a Gram (-) bacteria found in Brazil in the Negro River, have been reported to have multiple biological activities such as bactericide (Durán *et al.*, 2001) and is capable to induce apoptosis in various types of cancer cells (Melo *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2003; de Carvalho *et al.*, 2006; Kodach *et al.*, 2006). A moderate activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* promastigotas has been reported (Durán *et al.*, 1989; Leon *et al.*, 2001).

Based on the chemotherapeutics properties of violacein against tumor cells, bacteria, fungi, pathogenic protozoan and the urge for new potential antimalarial drugs; we evaluated the in vitro and in vivo capacity of this drug to combat *Plasmodium* blood stage forms, those responsible for the symptoms in malarial infections.

## MATERIAL AND METHODS

### Violacein purification

Violacein (Figure 1) 3-(1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona was isolated from *Chromobacterium violaceum* (CCT3496) as previously described (Rettori and Durán, 1998). Using the purification step with chloroform, cell wall and membrane residuals were extracted; and with the use of diethyl ether and ethanol a semi-purified extract was obtained. Finally, purified violacein was obtained by high performance liquid chromatography (HPLC). Those procedures have been described in the literature to obtain highly purified violacein. Dimethyl sulphoxide (DMSO) was used to dissolve violacein due to its poor solubility in water. Because violacein is a bacterial-derived product, we measured the lipopolysaccharide (LPS) levels

present in purified batches with the aid of the kit Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000® (Cambrex) and according to the manufacture's protocols. No detectable levels of LPS were observed.

### **Cultivation of *Plasmodium falciparum* infected-erythrocytes**

*P. falciparum* 3D7 strain was cultured in candle jars as described elsewhere (Trager and Jensen, 1976). Briefly, *P. falciparum* infected-erythrocytes (IE) were cultivated in fresh type O<sup>+</sup> human erythrocytes (UNICAMP, Blood Bank) suspended at 4% final hematocrit in complete medium (RPMI-1640 , pH 7.4 and 10% of homologous human plasma. For some experiments parasites were synchronized ( $\pm$  6 hours) by repeated 5% sorbitol treatment as stated by Schlichtherle *et al.* (2000).

### **In vitro antimalarial activity**

Drug activity assays were determined as described by Schlichtherle *et al.* (2000) by using [<sup>3</sup>H] hypoxanthine incorporation as an assessment of parasite growth. Assays were performed in 96 well plates in a final volume of 200  $\mu$ L, consisting in 100  $\mu$ L of complete medium without (controls) or with drugs and 100  $\mu$ L of *P. falciparum* infected-erythrocyte suspension (2% final hematocrit and 1% parasitemia). As violacein was dissolved in DMSO, in which the maximum concentration never exceeded 0.25%, this amount of DMSO was added to the complete medium in the respective controls. After 30 h of incubation at 37°C, 50  $\mu$ L of complete medium containing 10  $\mu$ Ci [<sup>3</sup>H] hypoxanthine was added to each well. After 18 h at 37°C, the cells were lysed with the aid of an automatic

cell harvester onto fiber filters (Millipore). The filters were counted for radioactivity (CPM) in a liquid scintillation spectrometer. The radioactivity background was determined by incubation of non-infected erythrocytes (nIE) in the same conditions as previous described. Each drug was tested in triplicate at least three times with different batches and cells, and parasite growth was compared to the control wells, representing 100% of parasite growth. Inhibition of parasite growth was calculated according to the following formula: % inhibition =  $100 - [(CPM \text{ sample} - CPM \text{ nIE}) / (CPM \text{ control wells} - CPM \text{ nIE}) \times 100]$ . Drugs efficacy was determined by comparison of compound concentration that led to 50% parasite growth inhibition (IC<sub>50</sub>). For the experiments involving synchronized parasites a single incubation of 18 h at 37°C in the presence of 10 µCi [<sup>3</sup>H] hypoxanthine (Amershan, UK) was performed.

### **In vivo antimalarial activity against murine-derived *Plasmodium***

Violacein *in vivo* activity was verified in C57BL/6 mice (7-10 week-old), weighing  $20 \pm 3$  g, purchased from Centro de Bioterismo-UNICAMP, Campinas, SP, Brazil and maintained in our specific pathogen-free animal facility. All experiments and procedures were approved by the UNICAMP Ethical Committee for Animal Research (protocol n° 985-1). Groups of 7-10 mice were infected i.p. with 10<sup>6</sup> IE of a non-lethal and lethal strains of *Plasmodium chabaudi chabaudi*, respectively AS (PcchAS) and AJ (PcchAJ), resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma). PcchAS and PcchAJ parasite lines were kindly provided by Dr. Hernando Del Portillo (Department of Parasitology, ICB, USP, São Paulo, SP, and Brazil) and Dr. Maria Regina d'Imperio (Department of Immunology, ICB, USP, São Paulo, SP, and Brazil), respectively. Pcch blood stage forms were stored in liquid

nitrogen after *in vivo* passages in C57BL/6 mice according to the protocol described elsewhere (Landau and Gautret, 1998). Mice were daily inoculated i.p. with 100  $\mu$ L of different doses of the drugs during 11 consecutive days, beginning on the day of infection (day 0). First dose was administrated 1 hour after parasite infection and for the following doses mice were injected 24 hours after the previously inoculation. For some assays violacein was administrated 5 days after parasite infection. The DMSO, used to solubilize violacein, did not exceed 1.25%. Sodium artesunate (a gift from Dr. Mary Ann Foglio, CPQBA, UNICAMP) was prepared by dissolve artesunic acid (98% pure) in 0.5% sodium bicarbonate solution and was obtained by ethanol extraction of 1 kg of artemisinin dried-plant material. Control groups of mice for sodium artesunate, chloroquine (Sigma, MO – USA) and violacein treatment received 0.5% sodium bicarbonate solution and medium without or with 1.25% DMSO; respectively. The ED<sub>50</sub>, the dose capable of inhibiting 50% of the parasite growth in respect to the control, was calculated based on a plot of the Log dose versus the activity (expressed as the percentage of the control) on the peak (day 7) of infection by PcchAS.

### **Parasitemia, red blood cell density and mice corporal mass assessment**

Percentage of parasitemia was daily determined by counting the number of IE in at least 1,000 erythrocytes in Giemsa-stained blood smears. Mouse red blood cells density was daily determined by counting the number of red blood cells relative to day -1 post-infection with the aid of a Neubauer chamber on day -1 post-infection, for *in vivo* assays. For *in vitro* assays, nIE was cultured in complete medium at 37°C in candle jars, without or with different drugs concentrations, and hematocrit was determined 0 h and 48 h after

incubation. The percentage of red blood cell density, relative to day -1 post-infection or to 0 h, was calculated with the following formula:  $100 \times (\text{n}^\circ \text{ nIE per mL of a determined day post-infection} / \text{n}^\circ \text{ nIE per mL on day -1 post-infection or at 0 h})$ . The percentage of mice corporal mass, relative to day -1, was calculated as previous formula replacing  $\text{n}^\circ \text{ nIE per mL}$  by mice weight in grams.

### **Preparation of histological sections of mouse organs**

Liver and spleen were collected after 10 or 7 days after violacein treatment from naïve or PcchAS infected-mice, respectively. The collected organs were fixed during 24 h in 10% neutral buffered paraformaldehyde, and then gradually dehydrated in ethanol solution at different concentrations (70 – 100%). Afterwards, the organs were immersed in xylol and embedded in paraffin. Serial sections, 5  $\mu\text{m}$  thick, were prepared and stained with hematoxylin-eosin.

### **Statistical analysis**

Statistical significance between treated and non-treated mice was determined by one-way ANOVA for comparison of parasitemia and red blood cells density, the Mann-Whitney U test was used to compare  $\text{ED}_{50}$  and  $\text{IC}_{50}$  of the different drugs used, and the Log-Rank test was used to compare the cumulative survival rates. Calculations were performed using BioEstat™ version 3.0. Values were considered significant when  $P < 0.05$

## RESULTS

### **In vitro and in vivo anti-malarial activity of violacein**

Based on the chemotherapeutics activities of the violacein against pathogenic protozoan parasites, we investigated if this drug could interfere directly to the growth of IE by *P. falciparum*, the world most prevalent human plasmodium. Thus, in order to choose the drug concentration with activity only to IE, we incubated various concentrations of violacein, and two other anti-malarial compounds, with nIE. After 48 hours of incubation at 37°C in a candle jar the percentage of red blood cell density, relative to 0 h, was determined. As shown in Figure 2A, concentrations over 10.0 µM of violacein were toxic to nIE.

Next, we evaluated the anti-plasmodial effects of violacein against *P. falciparum* IE, starting at 8.0 µM, concentration lower than the one found for violacein cytotoxicity in healthy human lymphocytes (Justo *et al*, 2005) and compared these effects with quinine (Fluka, MO-USA) and chloroquine treatment. Thus, after a 48 hour-incubation in candle jar, we determined the inhibition of parasite growth by measuring the incorporation of [<sup>3</sup>H] hypoxanthine for all tested drugs at different concentrations. According to Figure 2B, violacein inhibited parasite development starting at 0.063 µM and complete abrogated parasite viability in concentrations over 0.50 µM. Comparison of IC<sub>50</sub> values for violacein (106.99 ± 12.01), quinine (91.53 ± 17.14) and chloroquine (30.82 ± 0.88) revealed that violacein is as efficient as quinine, as no significant statistical difference was noticed ( $P>0.05$ ); but significantly ( $P<0.05$ ) 3 fold less powerful than chloroquine in killing the parasite. Finally, to precise whether the violacein anti-malarial effect was direct against young (rings, 0-18 h) or mature (throphiocytes and schizonts, 24-36 h) blood forms, we

incubated the drug with synchronized parasites and determined the inhibition values against these stages. As observed in Figure 2C, violacein was effective against both parasite stages and no statistical significant difference was noted.

As we demonstrated the capacity of violacein to control parasite development in vitro, we then determined whether this ability could be sustained in a mice model of infection, in which other features as biodisponibility and pharmacokinetics were taken into account. For this purpose, we chose Pcch as it shares many features, such as; the ability to invade mature red blood cells, a higher degree of synchronization of asexual blood forms and sequestration of schizont-infected erythrocytes, with *P. falciparum* (Beaute-Lafitte *et al.*, 1994; Gautret *et al.*, 1998; Mota *et al.*, 2000).

Thus, PcchAS infected-mice were treated with different doses of violacein 1 h after infection. As shown in Figure 3 and Table 1, violacein significantly reduced parasitemia of infected-mice in a dose dependent manner and even at low doses (0.75 mg/kg) at the peak of parasitemia (day 7); indicating parasite specificity. Of note, the two highest doses of the drug almost abolished parasitemia completely at the peak of the infection, 82 to 86% (Table 1), and indicating a plateau of maximum anti-malarial activity of violacein at 3.75 mg/kg. Nevertheless, animals inoculated with the highest dose presented superior inhibition values than the immediately below dose, especially on days out of the parasitemia peak than the peak of parasitemia (Table 1). These data demonstrated that, despite a plateau has been achieved, the highest dose sustained parasite burden more efficiently. We also observed that the two intermediated doses (3.75 and 0.75 mg/kg) were able to inhibit significantly parasitemia levels out of the peak of parasite development (Table 1). Thus, as human and murine malaria infection leads liver and spleen dysfunction and parasite accumulation in



these organs (Dumont, 1988.), we performed histological analysis on these two target organs. At the time of removal, on day 7 post-infection (p.i.) an enlarged spleen and liver was noted in non-treated (data not shown) and the presence of malarial pigment was noticed in these organs in comparison to treated animals (Figure 4).

Next, as we demonstrated a powerful capacity of violacein to control parasite development *in vivo*, we then investigated whether this effect could induce a less pronounced loss of mouse red blood cells, which normally occurs after the peak of infection as consequence of a large number of erythrocytes destruction. As it is shown in Table 2, administration of violacein, even at high doses, did not alter red blood cell (RBC) density levels before the peak of parasitemia, suggesting that this compound was not capable to interfere on animal haematopoiesis. In contrast, after day 7 of infection RBC density of non-treated mice dropped significantly, up to 50%, whereas minor effects were observed in animals treated with the two highest doses of violacein (Table 2). Of note, the total number of red blood cells of those mice did not alter in a significant way when we took into account the day before infection. These data showed that the anti-malarial activity of violacein prevents red blood cell loss after the peak of infection.

As during PcchAS infection a second peak of parasitemia is often observed on day 15-17 p.i. as a result of antigenic variation of this parasite (Cox, 1988.), and then resulting in parasite recrudescence; PcchAS infected-mice were treated with the highest dose of violacein and parasitemia levels were monitored until the day 22 p.i.. As observed in Figure 5A, and as expected, violacein treatment significantly ( $P < 0.0001$ ) reduced parasite growth up to 87.95% on day 7 p.i. in comparison to non-treated mice. Notably, on day 16 p.i., which represents the sixth day after the end of violacein treatment, mice were still able to

inhibit parasite development significantly ( $P<0.05$ ) up to 58.98% (Figure 5A); then indicating that this treatment was not able to induce parasite recrudescence. Next, to verify whether violacein administration could present an effect on parasite growth after the establishment of infection, PcchAS infected-mice were treated with violacein starting on day 5 p.i. (16% of parasitemia) until the 10 p.i.. As shown in Figure 5B, violacein treatment during patent parasitemia was able to reduce significantly ( $P<0.001$ ) parasite growth up to 53.96% in comparison to non-treated animals. Next, to determine the violacein protective effect mice were infected with the lethal strain PcchAJ and the survival rate were evaluated. As observed in Figure 6, whereas 100% of non-treated mice died up to day 10 p.i., 50% of those dying on day 7 p.i., all violacein treated animals did not succumb to infection up to day 8, dying on day 9 (10%) and 14 (10%) p.i., demonstrating the significant ( $P<0.0001$ ) protective effect of violacein.

Finally, we compared the ED<sub>50</sub> values between violacein treated animals with those inoculated with chloroquine or sodium artesunate. The average of ED<sub>50</sub> values for violacein, chloroquine and sodium artesunate was respectively  $0.94 \pm 0.26$ ,  $1.90 \pm 0.76$  and  $0.88 \pm 0.22$  mg/kg; indicating that violacein was as efficient as sodium artesunate ( $P>0.05$ ) and significantly 2 fold more powerful than chloroquine ( $P<0.05$ ) in combating parasite burden at the peak of infection.

### **Assessment of violacein toxicity in naïve mice**

To evaluate violacein toxic effects, we daily injected C57BL/6 mice i.p. during 11 consecutive days using 7.5 mg/kg of violacein, the highest concentration of the drug and the maximum amount that we were able to solubilize. As a control, a group of mice

received saline solution (NaCl 0.9%). We then measured daily (day 0-10) the RBC density and the weight loss of the naïve injected mice relative to day -1 before the first drug administration. According to Figure 7A, we did not notice a significant alteration ( $P>0.05$ ) on RBC density and neither on the mice corporal mass in respect to animals injected only with saline. Also, as shown in Figure 8, no apparent morphology alterations were observed after spleen and liver histological analysis collected after 10 consecutive days of drug administration when compared to non-injected animals.

## DISCUSSION

Our data clearly reveals an anti-malarial activity of the violacein, resulting in a higher inhibition (86%) of the parasitemia levels in *P. c. chabaudi* (AS)-infected animals, in comparison to violacein non-treated mice and prevent red blood cell loss in those mice. Moreover, violacein activity was able to protect 80% of mice infected with a lethal strain of murine-derived *Plasmodium*, and to inhibit parasite development even when administrated after parasite establishment on day 5 p.i.. Also, violacein effect was noticed against human *P. falciparum* blood forms and revealed to be direct against young and mature forms of the parasite. These data indicated that violacein can act at the beginning of blood infection, and against those forms, responsible for IE cytoadhesion (Costa *et al.*, 2006). Moreover, it is unlike that violacein will induce human immunosuppression, as our findings demonstrating that violacein was able to completely abolish *P. falciparum* development at 1.0  $\mu\text{M}$ , and in vitro cytotoxicity against healthy human lymphocytes was noticed in doses more than 10.0  $\mu\text{M}$  (Justo *et al.*, 2005)

Indeed, the effect of the violacein has also been observed against other pathogenic protozoan parasites, such as *Leishmania amazonensis* promastigotas and *Trypanosoma cruzi*. Nevertheless, in the assays against *T. cruzi* violacein presented a similar activity when compared to Nifurtimox™, an important chemotherapeutic used to treat Chagas' disease patients. However, violacein in vivo activity against this protozoan parasite did not reveal to be significant (Durán *et al.*, 1989). Besides its effect on *T. cruzi*, violacein was able to control parasitemia progress of *Leishmania amazonensis* promastigotas (Leon *et al.*, 2001). However, its effect was 10 times less pronounced than pentamidine, a classical drug used in the treatment of leishmaniasis (Leon *et al.*, 2001).

Notably, when we compared the ED<sub>50</sub> values in *P. c. chabaudi* (AS)-infected mice treated with other anti-malarial drugs revealed that violacein is significantly more efficient than chloroquine, since *P. c. chabaudi* (AS) has been described as a chloroquine sensitive parasite (Sohal and Arnot, 1993), and as efficient than sodium artesunate. Moreover, it is unlikely that the chloroquine used in our in vivo tests presented only partial activity, as same ED<sub>50</sub> values have been observed in other studies in *P. berghei*- and *P. c. chabaudi*-infected mice (Ancelin *et al.*, 2003). Thus, as violacein present a potent antimalarial activity against Pcch, and since this murine derived-*Plasmodium* has also been used for the understanding of drug-resistance *P. falciparum* isolates (Carlton *et al.*, 2001), these findings open perspectives for testing this drug against drug-resistant clones of this parasite. The fact that the highest dose of violacein almost eliminates completely the parasite in vivo, indicates that a higher dose might be enough to clear parasitemia. In fact, to achieve higher doses of violacein and to minimize possible toxic effects, new formulations in polymeric nanostructure systems are currently been employed. Nevertheless, Cravo *et al.*

(2001) have shown that partial immunity hosts are able to clear drug-resistant *P. c. chabaudi* parasites at higher rates than naïve mice. Based on this finding, it is conceivable that violacein might have more impact in areas where malaria transmission is unstable, Amazonic basin and other areas outside sub-Saharan Africa, which may compromise immunity acquisition at high levels.

When violacein was tested against *P. falciparum* (3D7), it showed to be as powerful as quinine, a conventional antimalarial drug used in many endemic countries, but its effect was three fold less efficient than chloroquine. Of note, resistance to quinine has been reported soon after its introduction in early eighties, in consequence this drug was combined to tetracycline later. However, this combination resulted in long periods of treatment raising problems related to patients' follow-up (Trigg and Kondrachine, 1998). It is believed that *P. falciparum* multi-drug resistance is associated to certain genes, such as *pfmdr1* and *pfmdr2* (Foote *et al.*, 1989), and those genes code for homologues of the P-glycoprotein, which has been implicated in drug resistance by tumor cells (Gottesman *et al.*, 1996). These findings strengths the use of violacein against multi-drug resistant parasites and make us to speculate that the anti-tumoral and the anti-malarial activity of violacein might be related. Finally, the discrepancies between IC<sub>50</sub> and ED<sub>50</sub> values observed for chloroquine activity are probably due to its immunosuppressor characteristics as previous reported (Fong *et al.*, 2007; Engchanil *et al.*, 2006; Ertel *et al.*, 1991).

Until now, violacein toxic effects in naïve mice have not been reported. In fact, despite the growing evidences of violacein toxic effect on tumor cells (Ferreira *et al.*, 2004.), and its activity against in vitro cultures of *Leishmania amazonensis* or *T. cruzi* (Leon *et al.*, 2001; Duran *et al.*, 1989), in only 1 study mice have been injected with higher

doses of violacein (10 mg/kg; Duran *et al.*, 2003). Nevertheless, in this particular study no toxic parameters in violacein-injected naïve mice have been considered. Thus; our study is the first to analyze in vivo toxic effect of this drug after 11 consecutive days of administration of violacein at high doses did not induce morphological changes in the spleen and liver, and neither alters corporal mass or RBC density. Although in those mice we did not assess liver and kidney enzymatic analyses, we have demonstrating evidences that violacein does not reduce the number of erythrocytes passive to be infected and might not downregulate mouse immune response.

Finally, the mechanisms involved in the anti-malarial activity of violacein against human and rodent has not yet been clarified. Nevertheless, recent findings showing an effect on *Staphylococcus aureus* cell wall (M.B., unpublished data) drive us to speculate that violacein might interfere on antigens expressed on the surface of IE. Further experiments are at the present moment being undertaken to examine in details the characteristics of anti-malarial activity of violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*, including cytoadhesion assays.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) S.C.P.L and Y.C.B were supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

## REFERENCES

- Ancelin M.L., Calas M., Bonhoure A., Herbute S., Vial H.J., 2003. In vivo antimalarial activities of mono- and bis quaternary ammonium salts interfering with Plasmodium phospholipid metabolism. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2598-2605.
- Beaute-Lafitte, A., Altemayer-Caillard V., Gonnet-Gonzalez, F., Ramiaramananana, L., Chabaud, A.G., Landau, I., 1994. The chemosensitivity of the rodent malarial - relationships with the biology of merozoites. *Int J Parasitol* 24, 981-986.
- Breman, J.G., 2001. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg* 64, 1-11.
- Carlton, J.M., Hayton, K., Cravo, P.V., Walliker, D., 2001. Of mice and malaria mutants: unravelling the genetics of drug resistance using rodent malaria models. *Trends Parasitol* 17, 236-242.
- Cox, F.E.G., 1988. Animal Models. pg: 1053-1543. In W.H. Wernsdorfer e McGregor I. In: *Malaria Principles and practice malariology*. Churchill Livingstone, London.
- Cravo, P., Culleton, R., Hunt, P., Walliker, D., Mackinnon, M.J., 2001. Antimalarial drugs clear resistant parasites from partially immune hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2897-2901.
- de Carvalho, D.D., Costa. F.T.M., Duran, N., Haun, M., 2006. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. *Toxicol In Vitro* 20, 1514-1521.

- Duran N., Campos V., Riveros R., Joyas A., Pereira MF., Haun M., 1989. Bacterial chemistry-III: preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products. *An Acad Bras Cienc* 61, 31-36.
- Duran, N., Justo, G.Z., Melo, P.S., De Azevedo M.B., Brito A.R., Almeida A.B., Haun M., 2003. Evaluation of the antiulcerogenic activity of violacein and its modulation by the inclusion complexation with beta-cyclodextrin. *Can J Physiol Pharmacol* 81, 387-396.
- Duran N., Menck C.F., 2001. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives *Crit Rev Microbiol* 27, 201-222.
- Engchanil C, Kosalaraksa P, Lumbiganon P, Lulitanond V, Pongjunyakul P, Thuennadee R, Tungsawad S, Suwan-apichon O. 2006 Therapeutic potential of chloroquine added to zidovudine plus didanosine for HIV-1 infected children. *J Med Assoc Thai.* Aug;89(8):1229-36.
- Ertel, W., Morrison, M.H., Ayala, A., Chaudry, I.H., 1991 Chloroquine attenuates hemorrhagic shock-induced suppression of Kupffer cell antigen presentation and major histocompatibility complex class II antigen expression through blockade of tumor necrosis factor and prostaglandin release. *Blood.* 78(7):1781-8.
- Ferreira, C.V., Bos, C.L., Versteeg, H.H., Justo, G.Z., Duran, N., Peppelenbosch, M.P. 2004. Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood* 104(5):1459-64.



- Fong, T., Trinkaus, K., Adkins, D., Vij, R., Devine, S.M., Tomasson, M., Goodnough, L.T., Lopez, S., Graubert, T., Shenoy, S., Dipersio, J.F., Khoury, H.J. 2007. A randomized double-blind trial of hydroxychloroquine for the prevention of chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 13(10):1201-6.
- Foote, S.J., Thompson, J.K., Cowman, A.F., Kemp, D.J., 1989. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell* 57, 921-930.
- Gautret, P., Coquelin, F., Mora-Silvera, E., Chabaud, A.G., Landau, I., 1998. Chronosexuality of *Plasmodium* species of Central African Muridae. *Parassitologia.* 40(3):255-8.
- Gottesman, M.M., Pastan, I., Ambudkar, S.V., 1996. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr Opin Genet Dev* 6, 610-617.
- Justo, G.Z., Ferreira, C.V., Peppelenbosch, M.P., Duran, N., 2005. Cellular and molecular targets in the evaluation of the antitumor potential of biocompounds *Annual Rev. Biomed. Sci.* 7, 1.
- Kodach, L.L., Bos, C.L., Duran, N., Peppelenbosch, M.P., Ferreira, C.V., Hardwick, J.C., 2006. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 27, 508-516.
- Le Bras, J., Durand, R., 2003. The mechanisms of resistance to antimalarial drugs in *Plasmodium falciparum*. *Fundam Clin Pharmacol* 17, 147-153.

- Leon L.L., Miranda C.C., De Souza A.O., Duran N. 2001. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *J Antimicrob Chemother* 48, 449-450.
- Melo P.S., Justo G.Z., de Azevedo M.B., Duran N., Haun M. 2003. Violacein and its beta-cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. *Toxicology* 186, 217-225.
- Melo P.S., Maria S.S., Vidal B.C., Haun M., Duran N. 2000. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 36, 539-543.
- Mota, M.M., Jarra, W., Hirst, E., Patnaik, P.K., Holder, A.A., 2000. Plasmodium chabaudi-infected erythrocytes adhere to CD36 and bind to microvascular endothelial cells in an organ-specific way. *Infect Immun* 68, 4135-4144.
- Nahlen, B.L., Clark, J.P., Alnwick, D., 2003. Insecticide-treated bed nets. *Am J Trop Med Hyg* 68, 1-2.
- O'Neill, P.M., 2005. The therapeutic potential of semi-synthetic artemisinin and synthetic endoperoxide antimalarial agents. *Expert Opin Investig Drugs* 14, 117-128.
- Rettori, D., Durán, N., 1998. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J Microbiol Biotechnol* 14, 685-688.
- Schlichtherle, S., Gandjour, A., Neugebauer, A., Rüßmann, W., Lauterbach K.W., 2000. The cost-effectiveness of screening strategies for amblyopia: a preliminary report. *Strabismus* 8(4):291-5.

- Sohal, A.K., Arnot, D.E., 1993. *Plasmodium chabaudi*: a short-term in vitro culture method and its application to chloroquine resistance testing. *Exp Parasitol* 76, 314-317.
- Targett, G.A., 2005. Malaria vaccines 1985-2005: a full circle? *Trends Parasitol* 21, 499-503.
- Trager, W., Jensen, J.B., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193, 673-675.
- Trigg P.I., Kondrachine A.V. 1998. Commentary: malaria control in the 1990s. *Bull World Health Organ.* 76, 11-16
- van Agtmael, M.A., Eggelte, T.A and van Boxtel, C.J., 1999. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medicine. *Trends Pharmacol Sci* 20, 199–205.
- WHO, 2000. Severe falciparum malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 1–90.
- Woodrow, C.J., Haynes, R.K., Krishna, S., 2005. Artemisinins. *Postgrad Med J*, 81, 71–78.

## FIGURE LEGENDS

**Figura 1. Violacein molecular strutucture.**

**Figure 2. Evaluation of violacein anti-malarial activity against *P. falciparum*. (A)**

Non-infected erythrocytes were cultivated during 48 hours at 37°C in the presence of different concentrations of violacein. The percentage of red blood cell density to control (without drug) was determined **(B)**. Inhibition of *P. falciparum* IE (3D7) growth cultivated during 48 h at 37°C with different concentrations of violacein; **(C)** and on young or mature stages of this parasite. Results are expressed as the mean of triplicates  $\pm$  standard deviation. Results represent one out of four independent assays using different drug batches.

**Figure 3. Determination of violacein effect on murine-derived *Plasmodium*.** Groups of 6-8 C57BL/6 mice were infected i.p. with  $10^6$  IE of *P .c. chabaudi* AS (PcchAS), and treated, or not, with different doses of violacein administered i.p. during 11 consecutive days, starting on day 0 at 1 hour after parasite infection. The parasitemia levels were determined daily. The results are expressed as the mean of a group mice  $\pm$  standard deviation. Results represent one out of four independent assays using different drug batches.

**Figure 4. Photomicrograph of spleen and liver tissue sections stained with hematoxylin-eosin.** PcchAS infected-mice (n=4 each group) were treated, or not, with 7.5 mg/kg of violacein, 7 days p.i. the spleen and liver were removed and tissue sections stained with hematoxylin-eosin were analyzed. Arrows indicates malaria pigment deposition.

**Figure 5. Analysis of the violacein anti-malarial activity on PcchAS recrudescence and after parasite establishment.** Groups of 6-8 C57BL/6 mice were infected i.p. with  $10^6$  IE of PcchAS, and treated, or not, with 7.5 mg/kg of violacein. **(A)** Parasitemia levels of infected-mice treated from 11 consecutive days (0-10 day) were daily monitored until day 22 post-infection. **(B)** Parasitemia levels of infected-mice treated after parasite establishment on day 5 (17%). The results are expressed as the mean of a group mice  $\pm$  standard deviation. Results represent one out of four independent assays using different drug batches.

**Figure 6. Survival curve of mice PcchAJ infected-infected treated, or not, with violacein.** Groups 6-8 C57BL/6 mice were infected with  $10^6$  IE of a lethal strain on *P. c. chabaudi*, PcchAJ, and treated with 7.5 mg/kg of violacein during 10 consecutive days (0-10), starting on day 0.

**Figure 7. Toxic effects of violacein in naïve mice.** Groups of 5 C57BL/6 mice were i.p. injected daily with the highest dose of violacein or saline during 10 consecutive days. The percentage of red blood cell density (**A**) and weight loss (**B**), relative to day -1 of injection, were determined daily. The results are expressed as the mean of a group of mice  $\pm$  standard deviation. Results represent one out of two independent assays using different drug batches.

**Figure 8. Photomicrograph of spleen and liver tissue sections stained with hematoxylin-eosin collected from naïve mice.** Groups of 4 mice were daily injected, or not, with 7.5 mg/kg of violacein during 10 consecutive days. After the end of the drug administration the spleen and liver were collected and hematoxylin-eosin stained tissue sections were analyzed.

Figure 1

115

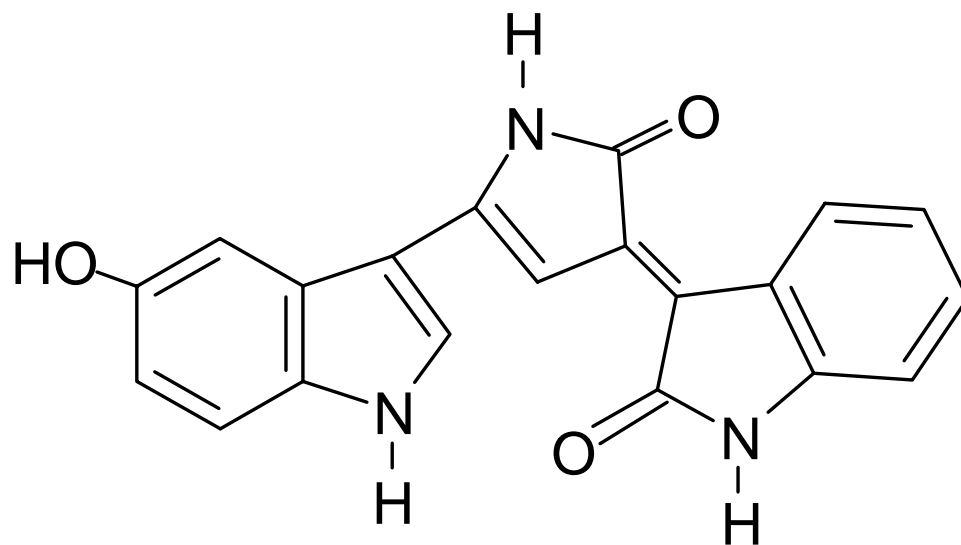


Figure 2

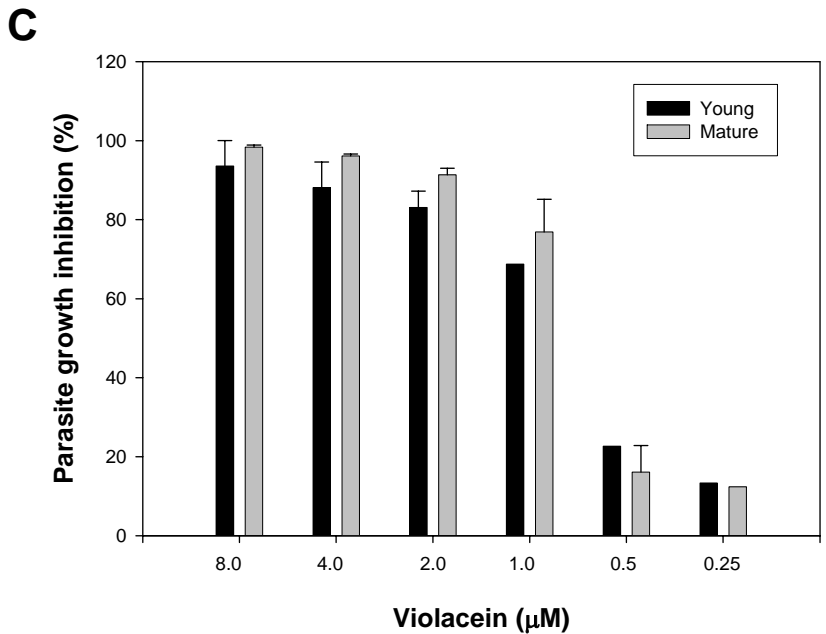
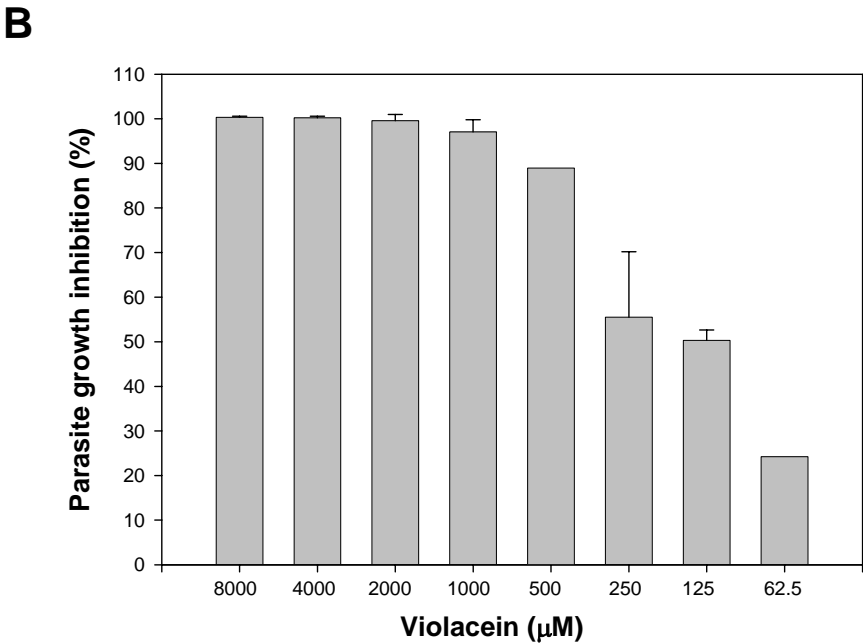
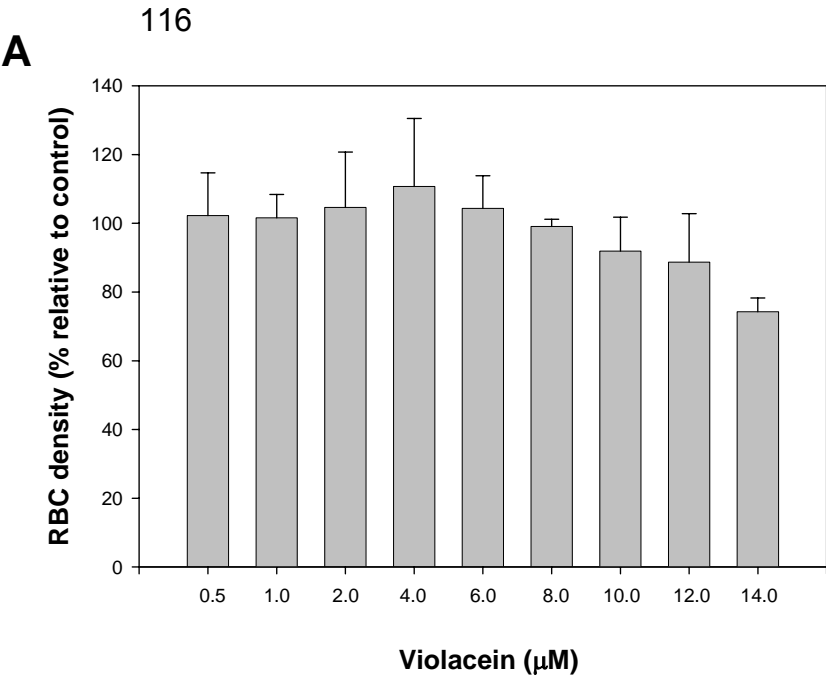
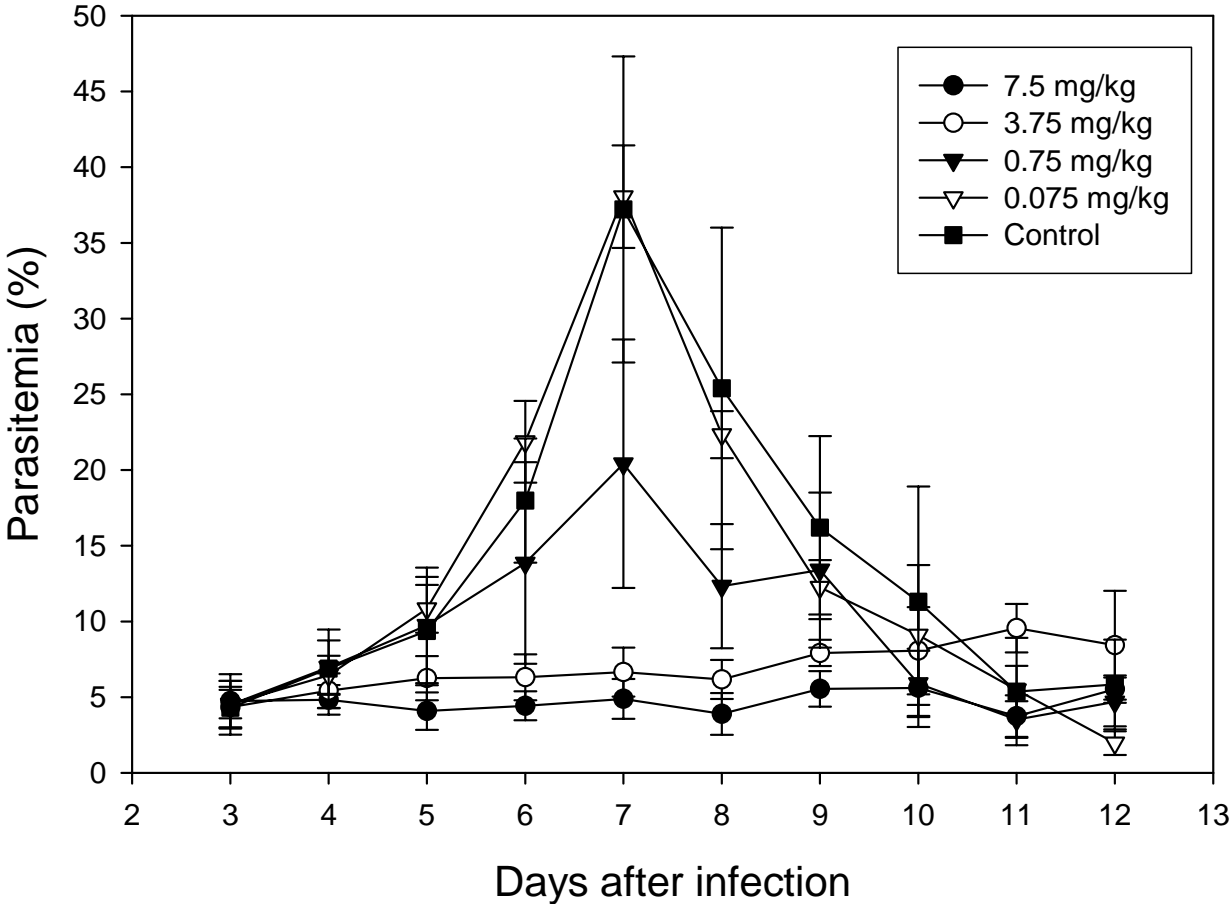




Figure 3

117



**Figure 4**

118

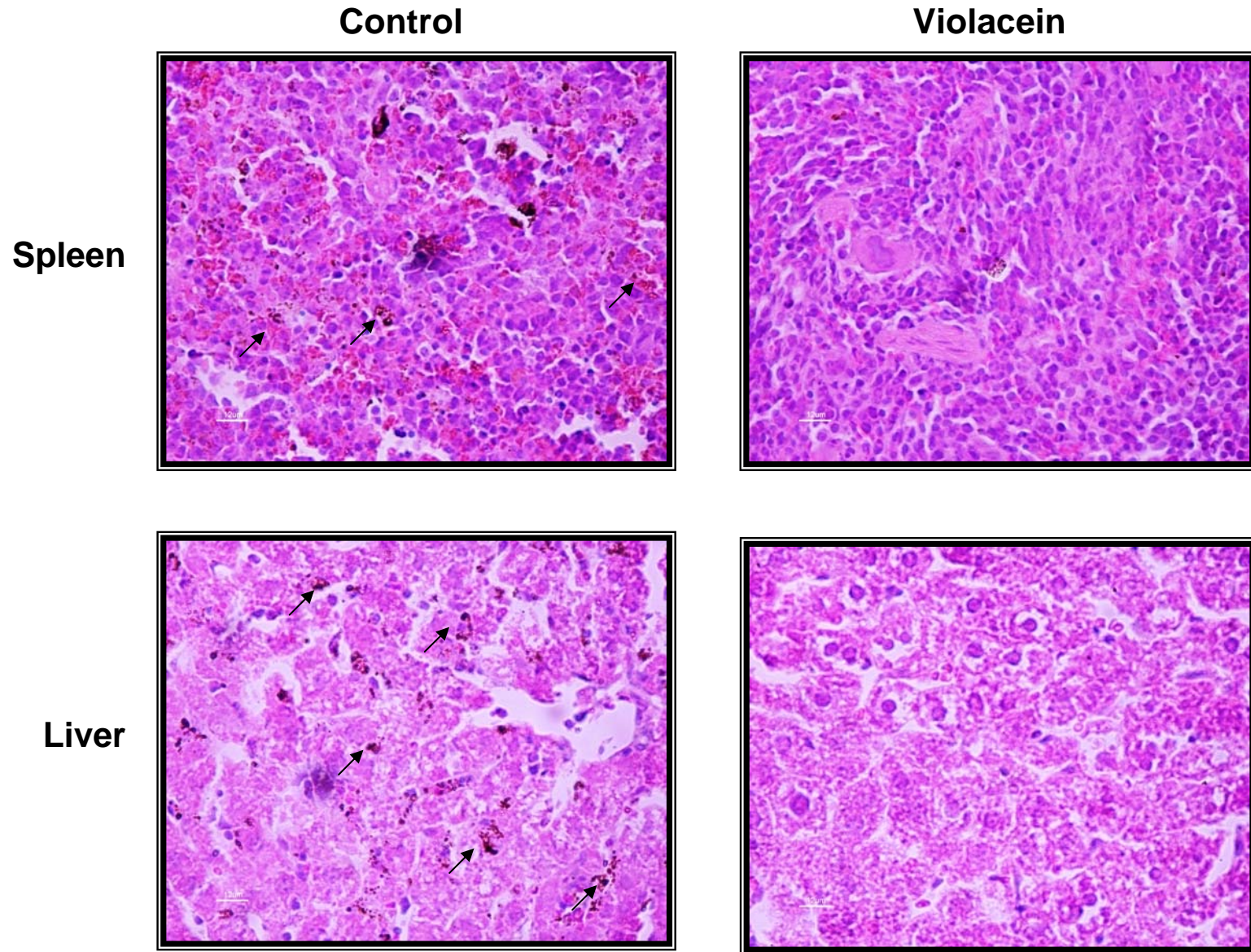
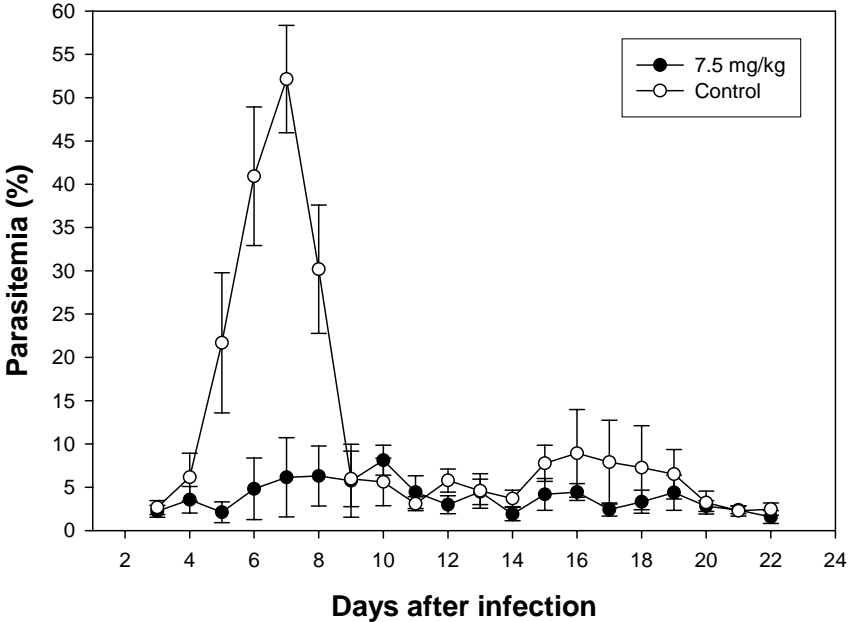


Figure 5

119

A



B

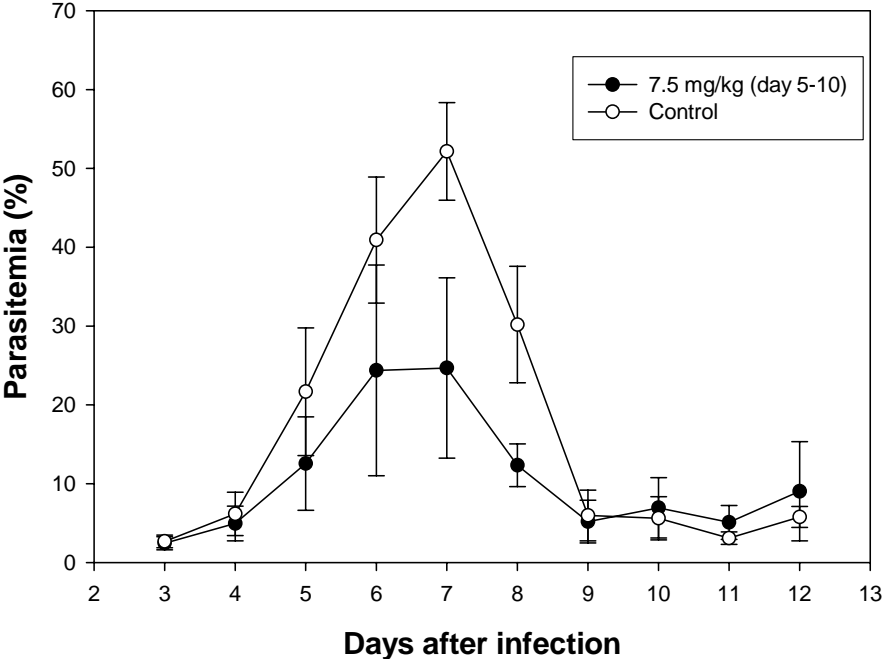


Figure 6

120

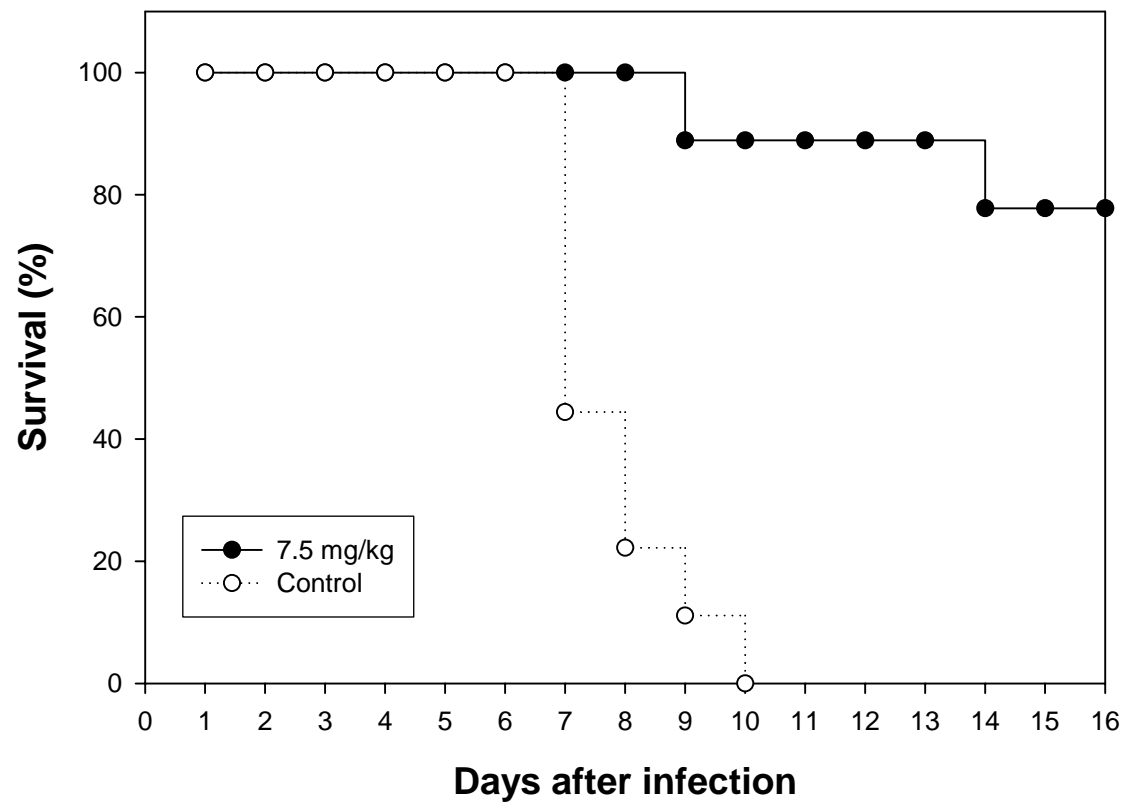
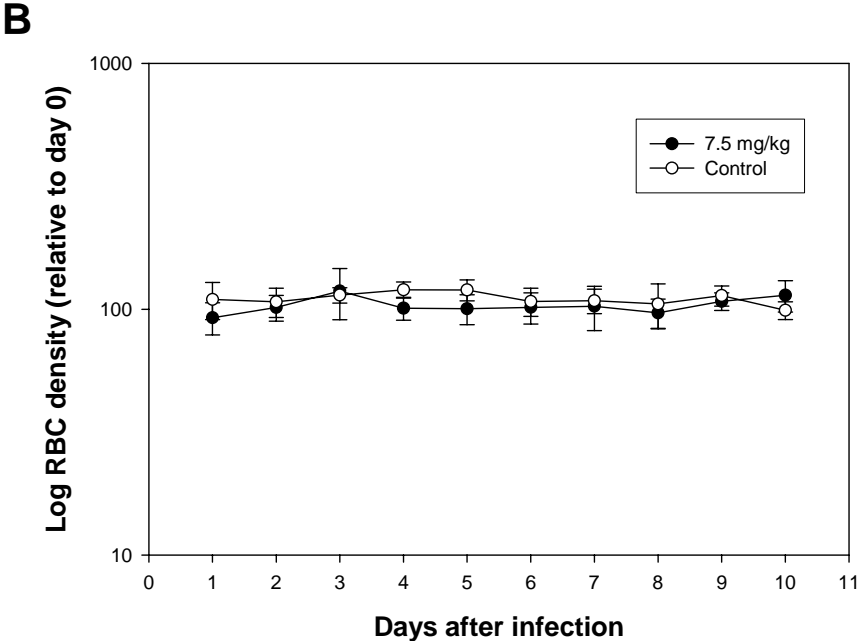
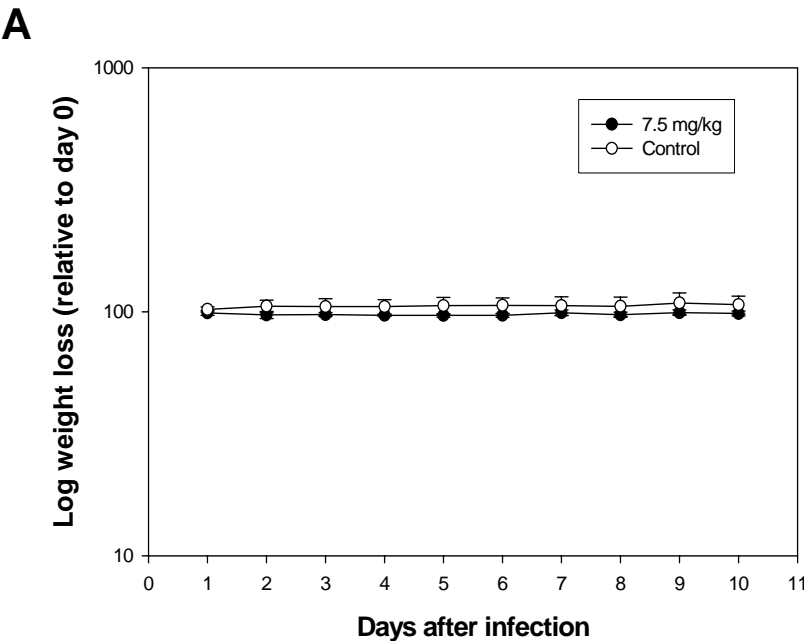


Figure 7

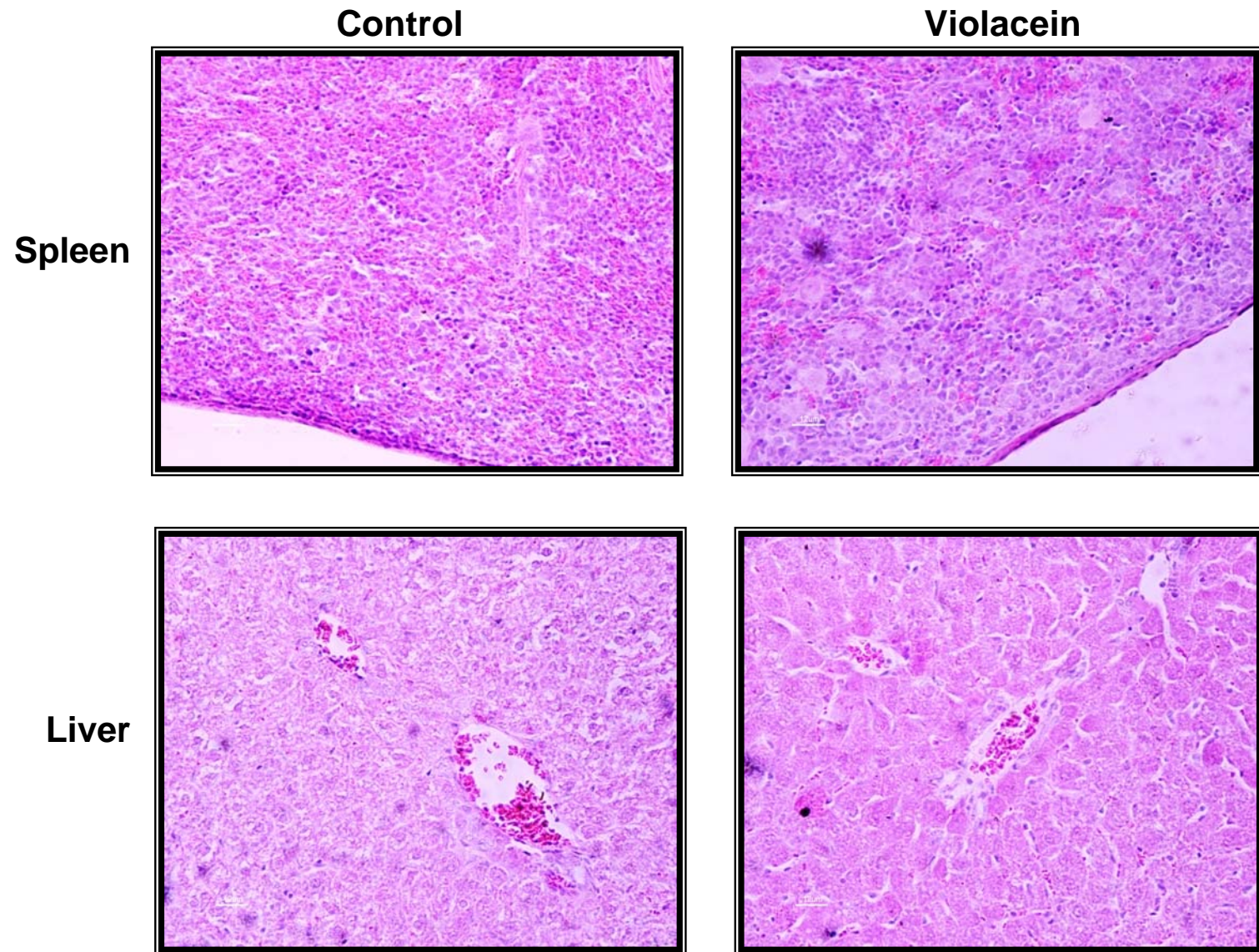
121





**Figure 8**

122



## *Anexo 2*

Patente BR PI0506399-0



*Depositante*

Protocolo

Número (21)

## DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de  
Certificado de Adição



**PI0506399-0**

depósito / /

e data de depósito)

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

**1. Depositante (71):**

1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

1.2 Qualificação: 1.3 CGC/CPF: 46068425000133

1.4 Endereço completo: CIDADE UNIVERSITÁRIA "ZEFERINO VAZ" - DISTRITO DE BARÃO GERALDO, EM CAMPINAS - SP.

1.5 Telefone: 0 XX 19 3788.5015

FAX: 0 XX 19 3788.5210

☒ continua em folha anexa

**2. Natureza:**

☒ 2.1 Invenção

☐ 2.1.1. Certificado de Adição

☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

**3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):**  
**USO DA VIOLACEÍNA, NA FORMA LIVRE OU**

☒ continua em folha anexa

**4. Pedido de Divisão do pedido nº. , de .**

**5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:**

Nº de depósito Data de Depósito ( 66)

**6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):**

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

☐ continua em folha anexa

**7. Inventor (72):**



Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)  
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: FÁBIO TRINDADE MARANHÃO COSTA

7.2 Qualificação: BRAS, PROF, SOLT.

7.3 Endereço: INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNICAMP



7.4 CEP: 13083970

7.5 Telefone 0 XX 19 3788.6271

☒ continua em folha anexa**8. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**☐ em anexo**9. Declaração de divulgação anterior não prejudicial** (Período de graça):

(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

☐ em anexo**10. Procurador (74):**

10.1 Nome MARIA CRISTINA VALIM LOURENÇO GOMES

CPF/CGC: 011.147.588-09

10.2 Endereço: PROCURADORIA GERAL DA UNICAMP

10.3 CEP: 13083970

10.4 Telefone 0 XX 19 3788.4772

**11. Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):

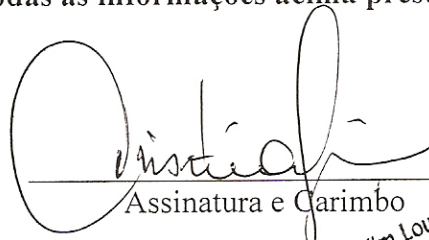
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	14 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	02 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de prioridade	fls.	<input type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	01 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros (especificar): TERMOS DE CES E TRANSF				05 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.10 Total de folhas anexadas:				24 fls;

**12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras**

Campinas, 08.11.05

Local e Data



Assinatura e Carimbo

Maria Cristina Valim Lourenço Gomes  
Procuradora de Universidade Subchefe  
Matrícula n.º 193861  
OAB/SP n.º 99243-B

## 1.2 Qualificação do depositante:

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP**,  
pessoa jurídica de direito público, autarquia estadual  
devidamente inscrita no CNPJ sob nº 46.068.425/0001-33 e  
isenta de inscrição estadual.

3. Continuação do título:

.....ENCAPSULADA EM SISTEMAS POLIMÉRICOS  
COMO ANTIMALÁRICO.

7. Dados dos outros quatro inventores:

**GISELLE ZENKER JUSTO**, brasileira, casada, química, portadora do RG nº 11970846 e do CPF nº 120373818-83, residente à Rua Dr. Carlos Guimarães, 230, apto. 11, Bairro Cambuí, em Campinas – SP.

**NÉLSON EDUARDO DURÁN CABALLERO**, brasileiro, divorciado, químico, portador do RG nº 9335810 e do CPF nº 685231148-15, residente à Av. Alexandre Casellato, 610, casa 69, Bairro Betel, em Paulínia – SP.

**PAULO AFONSO NOGUEIRA**, brasileiro, casado, biólogo, portador do RG nº 17299082-8 e do CPF nº 119334468-97, residente à Rua Vaticano, 4636, Bairro Jd. Das Mangueiras 2, em Porto Velho – RO.

**STEFANIE COSTA PINTO LOPES**, brasileira, solteira, estudante, portadora do RG nº 32.675.425-8 e do CPF nº 322.515.668-05, residente à Av. Dr. Romeu Tórtima, 389, apto. 01, Jd. Santa Genebra, em Campinas – SP.

"USO DA VIOLACEÍNA, NA FORMA LIVRE OU ENCAPSULADA EM SISTEMAS POLIMÉRICOS COMO ANTIMALÁRICO".

#### CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção se refere ao uso da violaceína extraída da *Chromobacterium violaceum* e de suas formulações, em sistemas poliméricos biodegradáveis nano- e micro-particulados, para manufatura de medicamentos para aplicação na área da saúde humana diretamente no  
10 tratamento de infecções maláricas já estabelecidas. A atividade antimalárica descoberta foi constatada, *in vivo*, em modelo de infecção experimental utilizando camundongos isogênicos infectados com formas sangüíneas de *Plasmodium chabaudi* e, *in vitro*, contra estágios sangüíneos de  
15 *Plasmodium falciparum*, principal causador da malária em humanos.

#### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

A malária continua sendo a principal doença parasitária do mundo, causando morbidade e  
20 mortalidade nas regiões tropicais e subtropicais em mais de 100 países. Estima-se que esta doença coloque em risco 2,4 bilhões de pessoas, principalmente aquelas expostas à infecção por *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, responsáveis por cerca de 100-300 e de 70-80 milhões dos casos anuais  
25 respectivamente (WHO, WHO Wkly. Epidem. Rec. 22, 161 (1997); Mendis e col., Am. J. Trop. Med. Hyg. 64, 97 (2001)). No Brasil, foram registrados cerca de 500.000 casos de malária, principalmente na região amazônica, sendo 76,4% registrados



por *P. vivax* e 24,6% por *P. falciparum* (FUNASA, Gerência Técnica de Malária. Avaliação epidemiológica da malária no Brasil (2000)).

O ciclo de vida do protozoário causador da doença pode ser dividido em duas fases distintas e inicia-se pela picada de uma fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. A primeira fase, denominada pré-eritrocítica, é assintomática e marcada pela infecção de hepatócitos por esporozoítas inoculados a partir da glândula salivar do mosquito. A fase seguinte, eritrocítica, é marcada pela invasão de hemácias pelas formas infectantes (merozoítas), e culmina na destruição das hemácias infectadas e no aparecimento dos sintomas associados à doença, tais como febre, sudorese, anemia entre outros (White, Em: Sherman IW, ed. *Malaria; parasite biology, pathogenesis, and protection*. Washington, DC: American Society for Microbiology. 371-417 (1998)).

Durante décadas, a malária vem sendo alvo de intensas campanhas com o objetivo de erradicar a transmissão do parasita por meio de inseticidas e quimioterapia. No entanto, essas estratégias não têm sido muito eficazes devido ao surgimento de cepas de parasitas resistentes às drogas convencionalmente usadas, tais como cloroquina, mefloquina, quinino e sulfadoxina-pirimetamina (Wensdorfer e Payne, *Pharmacol. Ther.* 50, 95 (1991)). Neste sentido, o extensivo uso da cloroquina (CQ) nos últimos 50 anos propiciou uma enorme pressão seletiva para o desenvolvimento de mecanismos de resistência a formas sanguíneas do parasita. Desta maneira, em 1977, a CQ foi

substituída pela sulfadoxina-pirimetamina (SP). Entretanto, a resistência a SP também aumentou desde os fins dos anos 1980, especialmente na África Oriental, onde tem sido utilizada em grande escala como medicamento de primeira  
5 linha, e em certas áreas da África Ocidental (Onyiorah e col., Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 90, 307 (1996); Trigg e col., Acta Tropica 63, 185 (1997); Ogutu e col., Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 94, 83 (2000)). Em 1980, depois destas duas drogas (CQ e SP) terem sido consideradas ineficientes,  
10 os pacientes com malária falciparum passaram a serem tratados com quinino e, no ano seguinte (1981), com uma combinação de quinino e tetraciclina (Trigg e Kondrachine, Em: Sherman IW, ed. Malaria; parasite biology, pathogenesis, and protection. Washington, DC: American Society for  
15 Microbiology, 11-22 (1998)). Todavia, um dos problemas associados a esta combinação de drogas era a necessidade de longos períodos de tratamento para a completa eliminação do parasita, dificultando o monitoramento do tratamento. Desta maneira, em 1984, foi introduzido um regime de tratamento a  
20 base mefloquina administrada em dose única. Entretanto, nos anos 90, resistência a mefloquina também começou a ser constatada na Tailândia, principalmente nas áreas de fronteira com o Camboja e o Vietnã (Nosten e col., Lancet 356, 297 (2000)). Nesta região do sudeste asiático a única  
25 forma de combate ao parasita é o tratamento a base de artemisininas (Trigg e Kondrachine, Em: Sherman IW, ed. Malaria; parasite biology, pathogenesis, and protection.

Washington, DC: American Society for Microbiology, 11-22 (1998)).

Preveno o surgimento e a expansão da resistência aos antimaláricos convencionais é de grande importância planejar novas formas de controle da malária. Sendo assim, uma das estratégias capazes de retardar o surgimento da resistência seria a obtenção de novos compostos antimaláricos. Outro fator que corrobora para a necessidade de novas drogas é a observação de resistência a todas as classes de antimaláricos com exceção das artemisininas. Desta maneira, caso apareçam cepas resistentes as artemisininas estaremos confrontando com uma doença sem tratamento, principalmente no sudeste asiático (Hastings e D'Alessandro, Parasitol. Today 16, 340 (2000)).

A violaceína (3-(1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona) é um pigmento violeta, insolúvel em água, mas solúvel em etanol, acetona e dimetilsulfóxido (DMSO), extraída da *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa e saprófita (Rettori e Durán, PIBr 9702986-6 (1997)). A violaceína possui ampla atividade antibiótica, incluindo ação antimicobacteriana (Durán e col., PIBr 9801307 (1998); Durán e De Souza, PIBr 0101346-7 (2001)), além de ação fungicida (Shirata e col., Japan Agric. Res. Quart. 34, 131 (2000)) e antiviral contra herpes e poliovírus (May e col., Ger. Offen. DE 3935064 (1991)).

Os efeitos da violaceína também foram observados contra protozoários patogênicos. Em ensaios



para medir sua atividade contra o *Trypanosoma cruzi* a violaceína apresentou ação similar ao Nifurtimox, um importante quimioterápico utilizado no tratamento da doença de Chagas (Durán e col., PIBr 9801307 (1998); Durán e Menck, Crit. Rev. Microbiol. 27, 201 (2001)). Além de atividade tripanossomicida, estudos de Leon e col. (J. Antimicrobial Chemother. 48, 449 (2001)) mostraram que a violaceína também apresenta atividade contra *Leishmania* spp., apesar de apresentar-se dez vezes menos ativa que a pentamidina, a segunda droga mais usada no tratamento de leishmanioses.

Nos últimos anos a atividade antitumoral da violaceína tem sido amplamente estudada, apresentando resultados promissores tanto na forma livre como formulada em diferentes veículos (Durán e Haun, PIBr 9702918 (1997); Durán e col., PIBr 9801307 (1998); Melo e col., Toxicology, 186, 217 (2003)). Recentemente, Ferreira e col. (Blood, 104, 1459 (2004)) estudaram o mecanismo molecular de indução de apoptose pela violaceína em células de leucemia mielóide humana, estabelecendo as vias de sinalização envolvidas neste processo e a seletividade principalmente em relação às células de sangue normal.

Apesar de atividade quimioterápica, a violaceína apresenta desvantagens como, por exemplo, instabilidade química e baixa solubilidade em água e fluidos biológicos. Estes problemas podem ser contornados pela incorporação em micro- e nanopartículas poliméricas biodegradáveis com propriedades físico-químicas apropriadas (Kabanov e col., J. Control. Release, 82, 182

(2002); Agnihotri e col., J. Control. Release, 100, 5 (2004)).

#### BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada com o uso da violaceína extraída da *Chromobacterium violaceum* e de suas formulações, em sistemas poliméricos, para manufatura de medicamentos para aplicação na área da saúde humana diretamente no tratamento de infecções maláricas já estabelecidas.

Mais especificamente, a presente invenção está baseada nas propriedades quimioterápicas da violaceína, livre e formulada, contra células tumorais, bactérias, fungos e, principalmente, contra protozoários patogênicos ao homem, avaliamos in vivo e in vitro a capacidade quimioterápica deste composto no combate de formas sangüíneas de *Plasmodium* spp.. Além disso, foram desenvolvidas formulações de violaceína em sistemas nano- e microparticulados de liberação controlada, como a incorporação em micelas de copolímero bloco Pluronic®, e o encapsulamento em nano- e micropartículas à base de quitosana, para determinação de atividade antimalárica. Em estudos in vivo mostramos a existência de atividade anti-plasmodial, resultado de uma redução significativa da parasitemia dos animais tratados com o composto em relação ao grupo controle (infectados e não tratado). A magnitude da atividade anti-plasmodial in vivo foi constatada em diferentes dias da infecção, quando comparada aos animais infectados e não tratados. Além da atividade antimalárica

observada para as diferentes formulações de violaceína, micelas de Pluronic® contendo violaceína apresentaram maior solubilidade e estabilidade. Além dessas características, a natureza catiônica dos sistemas nano- e microparticulados à base de quitosana também facilitou a interação com hemácias infectadas pelo parasita, as quais apresentam uma alta carga residual negativa na superfície.

Os ensaios *in vitro* realizados com formas sangüíneas de *P. falciparum* revelaram que a violaceína é 300 vezes mais potente do que o quinino, umas das drogas indicadas no tratamento contra a malária.

Os resultados de efeitos *in vivo* e *in vitro* da atividade antimalárica da violaceína e suas formulações mostram claramente que esta invenção tem aplicação na área de saúde humana, preferencialmente mas não de forma limitada, no combate às formas sangüíneas de *Plasmodium spp.*, responsáveis pela sintomatologia da doença.

Nos últimos anos, o surgimento de cepas de parasitas resistentes aos agentes antimaláricos convencionalmente usados, tais como cloroquina, mefloquina, quinino e sulfadoxina-pirimetamina e; considerando-se a expansão global de casos de malária resistente a todas as classes de antimaláricos disponíveis, com exceção das artemisininas; a obtenção de novos compostos antimaláricos é de grande importância e urgência. As propriedades quimioterápicas da violaceína, livre e formulada, no combate de formas sangüíneas de *Plasmodium spp.*, descritas na presente invenção, indicam seu potencial como antimalárico

alternativo no tratamento de formas resistentes da doença e também como tratamento de primeira escolha. Em particular, ensaios in vitro realizados com formas sanguíneas de *P. falciparum* revelaram que a violaceína é 300 vezes mais potente do que o quinino, umas das drogas atualmente indicadas no tratamento contra a malária.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada com o uso da violaceína extraída da *Chromobacterium violaceum* e de suas formulações, em sistemas poliméricos, para manufatura de medicamentos para aplicação na área da saúde humana diretamente no tratamento de infecções maláricas já estabelecidas.

O processo de formulação da violaceína em sistemas poliméricos nano- e microparticulados envolve seu encapsulamento em: micelas de Pluronic<sup>®</sup> F68, P85 ou L61; nanopartículas de poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) modificadas superficialmente com quitosana; e nano- e micropartículas à base de quitosana preparadas pelas técnicas de coacervação/precipitação e de precipitação/cross-linking (reticulação química).

Para o estudo de atividade antimalárica, a violaceína foi extraída da *Chromobacterium violaceum*, purificada e caracterizada de acordo com a metodologia descrita por Rettori e Durán (PIBr 9702986-6 (1997)).

Para a formulação de violaceína com micelas de Pluronic<sup>®</sup> F68, P85, ou L61, foram preparadas soluções do composto com os copolímeros bloco pela adição de



violaceína em tampão fosfato-salina (PBS; pH 7,4) contendo várias concentrações de Pluronic® F68, P85 ou L61 segundo descrito anteriormente (Kabanov e col., *Macromolecules*, 28, 2303 (1995); Batrakova e col., *Pharm. Res.*, 16, 1373 (1999); 5 Kabanov e col., *J. Control. Release*, 82, 182 (2002)).

Sistemas nano- e microestruturados à base de quitosana foram obtidos pelas seguintes técnicas (Agnihotri e col., *J. Control. Release*, 100, 5 (2004)): a) coacervação/precipitação (com NaOH, 10 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>); b) precipitação/cross-linking (reticulação química). Nesse último, glutaraldeído foi utilizado como agente de reticulação química (cross-linker) para as partículas pré-formadas por precipitação. Foram avaliados os efeitos da 15 formulação (concentração de quitosana, massa molar) e do processo (tempo de reticulação, temperatura) nas propriedades das partículas como tamanho, permeabilidade e degradabilidade.

Nanopartículas de poliésteres biodegradáveis (poli-[lactídeo-co-glicolídeo] - PLGA) 20 modificadas superficialmente por quitosana também foram desenvolvidas adotando-se a metodologia descrita na literatura por Kumar e col. (*Biomaterials*, 25, 1771 (2004)): um processo de emulsificação seguida de extração do solvente por evaporação ou diluição, modificado pela incorporação de 25 quitosana no sistema aquoso (fase contínua da emulsão).

As nano/micropartículas obtidas pelos diferentes métodos de preparação foram caracterizadas para determinação das seguintes propriedades: distribuição



violaceína foi capaz de inibir significativamente a replicação do parasita de maneira dose-dependente. Nos animais tratados com doses entre 0,5 e 5 mg/kg, níveis de inibição de 60 a 70% ( $p < 0,001$ ), nos dias 6 e 7 pós-infecção, foram obtidos em relação aos animais não tratados. Além disso, inibição de 30 a 40% ( $p < 0,01$ ) foi observada no grupo de animais tratados com uma dose 100 vezes menor, confirmando, in vivo, o elevado grau de eficiência da violaceína contra HI.

Nos dias 6 e 7 pós-infecção observamos as maiores inibições da carga parasitária, entre 60 e 70% ( $p < 0,001$ ). Diferentemente dos animais não tratados, e em consequência desta significativa redução da parasitemia, os animais inoculados com a violaceína não apresentaram uma pronunciada redução no hematócrito. Além disto, nos animais tratados com doses entre 0,05 e 5 mg/kg de violaceína não foi observado redução significativa do hematócrito ao longo da infecção em relação ao dia 0. Estes dados mostram que a atividade in vivo da violaceína é capaz de reduzir de maneira significativa a parasitemia, não permitindo o desenvolvimento de anemia associada, mesmo após o dia 7, pico da infecção. Ainda no modelo in vivo, em estudos de toxicidade mostramos que animais não infectados e tratados com a violaceína não apresentaram redução significativa no seu peso nem nos seus hematócritos, demonstrando a especificidade do efeito antimalárico da violaceína.

A porcentagem de variação do hematócrito, relativa ao dia 0, de cada animal foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:  $[(\text{Número de hemácias} \times 10^9/\text{mL no dia } n \text{ pós-infecção} / \text{Número de hemácias} \times 10^9/\text{mL no dia } 0) \times 100]$ . Utilizando esta fórmula observamos que animais inoculados com violaceína (0,5 a 5 mg/kg) apresentaram uma menor variação do hematócrito, em relação ao grupo de animais não tratados. Esta pequena alteração no número de hemácias também é constatada nos dias subseqüentes ao pico da parasitemia (Dia 7), um período caracterizado por uma grave anemia no grupo não tratado. Nos dias 7 - 9 pós-infecção, porcentagens de variação do hematócrito, relativo ao dia 0, de 70 - 100% foram obtidas para o grupo de camundongos tratados com 0,5 - 5 mg/kg ( $p < 0,05$ ), enquanto que variações de 20 - 55% foram obtidas para o grupo controle não tratado. Além disso, nos dias 8 e 9 pós-infecção os animais tratados com a violaceína não apresentaram variação no hematócrito em relação ao dia 0. Estes resultados demonstram que altas doses de violaceína são capazes de inibir significativamente o crescimento do parasita e que a parasitemia residual não é suficiente para causar uma anemia significativa nos dias após a infecção.

Nenhuma alteração significativa no hematócrito e no peso de camundongos sadios submetidos ao mesmo tratamento com violaceína foi observada ao longo dos 10 dias de tratamento, confirmando os resultados de atividade anti-plasmodial da violaceína.



Os ensaios in vitro foram conduzidos utilizando-se formas sangüíneas de *Plasmodium falciparum*. Nestes ensaios, hemácias infectadas pelo *P. falciparum* (PfHI) da cepa 3D7 foram cultivadas de acordo com Trager e Jensen (Science, 193, 673 (1976)) em meio RPMI suplementado, na presença de sangue humano O<sup>+</sup> e a uma temperatura de 37°C durante 48 horas. A porcentagem de parasitemia foi determinada a partir de esfregaços do material de cultura corados por Giemsa, contando-se o número de eritrócitos infectados viáveis em 1.000 hemácias.

A atividade quimioterápica da violaceína contra *Plasmodium falciparum* foi testada em relação às drogas de referência quinino e cloroquina. Neste sentido, formas sangüíneas de *P. falciparum*, a uma parasitemia inicial de 0,4%, foram incubadas durante 48 horas a 37°C na presença de meio de cultura (controle) ou diferentes concentrações de violaceína, quinino e cloroquina. Após o período de incubação, não foi constatada atividade antimalárica pela cloroquina, fármaco que o parasita já desenvolveu resistência. Entretanto, concentrações relativamente baixas de violaceína (0,5 - 2 µmol/L) foram capazes de inibir em mais de 50% o desenvolvimento do parasita em relação ao controle (parasitemia final 2,5%). Em contraste, quando utilizado o quinino foi necessária uma dose 300 vezes superior a da violaceína, para se atingir uma inibição de 50% da parasitemia. Estes resultados demonstraram que a violaceína é 300 vezes mais potente do que o quinino, fármaco utilizado

convencionalmente nos tratamentos antimaláricos, em inibir formas sangüíneas de *P. falciparum*, resistentes a cloroquina. Resultados similares foram obtidos para as formulações de violaceína preparadas em micelas e nano/micropartículas à base de quitosana. Não foram observados efeitos tóxicos em hemácias humanas sadias (hematócrito de 2%) incubadas com violaceína, quinino ou cloroquina nas mesmas condições descritas para hemácias infectadas.

A descrição acima da presente invenção foi apresentada com o propósito de ilustração e descrição. Além disso, a descrição não tenciona limitar a invenção à forma aqui revelada. Em consequência, variações e modificações compatíveis com os ensinamentos acima e a habilidade ou conhecimento da técnica relevante, estão dentro do escopo da presente invenção.

As modalidades acima descritas tencionam melhor explicar os modos conhecidos para a prática da invenção e para permitir que os técnicos na área utilizem a invenção em tais, ou outras, modalidades e com várias modificações necessárias pelas aplicações específicas ou usos da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso da violaceína **caracterizado por** ser como antimalárico e ser para manufatura de formulações contendo violaceína, na forma livre ou encapsulada,  
5 sintéticas ou extraída de bactérias no combate do desenvolvimento de espécies do gênero Plasmodium spp, inibindo significativamente a replicação do parasita de maneira dose-dependente.
2. Uso da violaceína, de acordo com a reivindicação 1,  
10 **caracterizado pelo** fato da violaceína, quando encapsulada, poder ser, preferencialmente, em sistemas poliméricos ou micelares e nano/microparticulados.
3. Uso da violaceína, de acordo com a reivindicação 2,  
15 **caracterizado pelo** fato do sistema polimérico poder ser, opcionalmente biodegradável.
4. Uso da violaceína, de acordo com a reivindicação 2,  
**caracterizado pelo** fato das nano/microparticulas serem, preferencialmente compostas a base de quitosano.
5. Uso da violaceína, de acordo com a reivindicação 1,  
20 **caracterizado pelo** fato da violaceína ser extraída, preferencialmente, de bactérias do gênero Chromobacterium violaceum.
6. Uso da violaceína, de acordo com as reivindicações acima, **caracterizado pelo** fato de que foram realizados  
25 ensaios utilizando um modelo de infecção experimental de camundongos C57BL/6 inoculados por via intraperitonal (i.p.) com Plasmodium chabaudi chabaudi AS; neste experimento, grupos de 6 camundongos C57BL/6

- foram infectados(i.p.) com  $10^6$  HI (hemácias infectadas); em seguida, os animais infectados foram tratados por meio de injeções(i.p.) diárias, dia 0 -10 pós-infecção, com diferentes doses de violaceína diluída em 0,5 - 2,0% de DMSO; após o terceiro dia de infecção, a porcentagem de parasitemia foi determinada diariamente contando-se o número de HI em 1.000 hemácias, em esfregaços de sangue obtido da cauda e corados com Giemsa; os resultados obtidos da parasitemia revelaram uma redução da carga parasitária.
- 5
- 10
7. Uso da violaceína, de acordo com as reivindicações acima, **caracterizado** pelo fato de ser administrado, preferencialmente, uma dose entre 0,5 e 5 mg/kg, nos dias 6 e 7 pós-infecção.
- 15
8. Uso da violaceína, de acordo com as reivindicações acima, **caracterizado** pelo fato de que a porcentagem de variação do hematócrito, relativa ao dia 0, de cada animal foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:
- 20
- $$[(\text{Número de hemácias} \times 10^9/\text{mL no dia } n \text{ pós-infecção} / \text{Número de hemácias} \times 10^9/\text{mL no dia } 0) \times 100].$$

RESUMO

"USO DA VIOLACEÍNA, NA FORMA LIVRE OU ENCAPSULADA EM SISTEMAS POLIMÉRICOS COMO ANTIMALÁRICO".

5 A presente invenção se refere a determinação da atividade anti-plasmodial (antimalárica) da violaceína extraída da *Chromobacterium violaceum*; a presente invenção terá seu uso na área da saúde, tanto humana como animal, quando da necessidade do tratamento de

10 infecções e doenças já estabelecidas, estas causadas por plasmodium, agente causador da malária; Os resultados de efeitos in vivo e in vitro da atividade antimalárica da violaceína mostram claramente que esta invenção tem aplicação na área de saúde humana, mais especificamente no

15 combate às formas sangüíneas de *Plasmodium* spp., responsáveis pela sintomatologia da doença.